



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Actividad antioxidante y citotóxica de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de Argemone subfusiformis G.B. Ownbey “Cardo santo”

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTORES

María del Rosario CIEZA HEREDIA

Edith Mayrelli CASTILLO LABORIO

ASESOR

Dr. Pablo Enrique BONILLA RIVERA

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Cieza María, Castillo E. Actividad antioxidante y citotóxica de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey “Cardo santo” [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2019.

HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

INFORMACIÓN GENERAL	
Título del Proyecto	Actividad antioxidante y citotóxica de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey "Cardo santo"
Área de investigación (*)	Ciencias Químicas
Ubicación geográfica donde se desarrolla la investigación (incluir localidades y/o coordenadas geográficas)	Facultad de Farmacia y Bioquímica- UNMSM - Jr. Puno N°1002 - Lima
Institución que financia si corresponde	Ninguna
Año o rango de años que abarcó	2018-2019
DATOS DEL TESISISTA	
Apellidos y Nombres	Cieza Heredia María del Rosario
Número de matrícula	09040056
DNI	41712583
Indicar si es egresado o si aún está cursando estudios, de ser así especificar el año de estudios	Egresada
Código ORCID (opcional)	-----
DATOS DEL TESISISTA	
Apellidos y Nombres	Castillo Laborio Edith Mayrelli
Número de matrícula	10040134
DNI	44784864
Indicar si es egresado o si aún está cursando estudios, de ser así especificar el año de estudios	Egresado
Código ORCID (opcional)	-----
DATOS DEL ASESOR	
Apellidos y nombres	Bonilla Rivera Pablo Enrique
Código docente:009008 Categoría: Principal Clase: Tiempo completo	
Máximo grado alcanzado	Doctor
Código ORCID (obligatorio)	0000-0002-7286-6810
Título profesional	Químico Farmacéutico
Departamento Académico al que pertenece	Química Básica y Aplicada
Instituto de Investigación al que pertenece	Recursos y Productos Naturales (coordinador).
Grupo de investigación al que pertenece indicar si es coordinador, miembro o adherente del grupo de investigación	Fitofármacos y Salud Miembro titular

(*) Según documentos oficiales de la Facultad



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

Actividad antioxidante y citotóxica de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey "Cardo santo"

Que presentan las Bachilleres en Farmacia y Bioquímica:

**MARÍA DEL ROSARIO CIEZA HEREDIA Y
EDITH MAYRELLI CASTILLO LABORIO**

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

Dieciocho (18)

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico(a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 05 de noviembre de 2019

Dra. Arilmi Rosa Gorriti Gutiérrez
Presidenta

Mg. Elizabeth Liz Chávez Hidalgo
Miembro

Mg. Oscar Herrera Calderón
Miembro

Q.F. Fritz Fedor Choquesillo Peña
Miembro

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"



A mis queridos padres Carolina y
Wilfredo, quienes con su amor,
comprensión y sacrificio me enseñaron
a luchar por mis objetivos; a ellos que
fueron mi principal cimiento para la
construcción de mi vida profesional y
deseos de superación.
Gracias Dios por concederme los
mejores padres.

A mis padres Pascual y Benita con todo mi amor y cariño, porque ellos han dado razón a mi vida, por sus consejos, su apoyo incondicional y su paciencia, todo lo que soy es gracias a ellos.

A Richard, Vanesa y Mirian por su cariño, complicidad y por todo los bellos momentos que hemos pasado juntos.

A Carlos por sus palabras, cariño, confianza y el apoyo que siempre me ha brindado todo este tiempo.

A toda mi familia que es lo mejor y más valioso que Dios me ha dado.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por habernos acompañado y guiado a lo largo de nuestras carreras y permitirnos la culminación de esta tesis.

A nuestra querida alma mater, Universidad Nacional Mayor de San Marcos y a la Facultad de Farmacia y Bioquímica por formarnos y guiarnos a ser buenas profesionales.

A nuestro asesor de tesis, Dr. Pablo Bonilla Rivera por su orientación, paciencia, confianza, motivación y dirección en la realización de esta tesis.

A la Dra. Silvia Suárez Cunza, por su generosidad y por compartirnos sus valiosos conocimientos.

A la Dra. Mónica Retuerto Figueroa, por sus apreciables consejos y valiosas aportaciones.

A la Sra. Lina Carrasco Guerrero de Laborio y al Sr. Luciano Laborio Caballero, por su hospitalidad, gran calidad humana y amable apoyo en la obtención de la especie vegetal.

A los Señores Miembros del Jurado, por la extenuante revisión de esta tesis, así como sus importantes aportes en la realización de la misma.

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABLAS	xiii
RESUMEN	xvi
SUMMARY	xvii
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Hipótesis.....	3
1.2. Objetivos.....	3
1.2.1. Objetivo general.....	3
1.2.2. Objetivos específicos.....	3
II. GENERALIDADES	4
2.1. Marco teórico.....	4
2.1.1. Familia Papaveraceae.....	4
2.1.2. Género Argemone.....	5
2.1.3. Aspectos botánicos de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey.....	7
2.1.3.1. Taxonomía.....	7
2.1.3.2. Descripción botánica.....	8
2.1.3.3. Distribución geográfica.....	9
2.1.3.4. Composición química.....	10
2.1.3.5. Propiedades medicinales.....	10
2.1.4. Compuestos fenólicos.....	11
2.1.4.1. Ácidos fenólicos.....	12
2.1.4.2. Flavonoides.....	13
2.1.5. Actividad Antioxidante.....	21
2.1.5.1. Estrés oxidativo.....	21
2.1.5.2. Radicales libres.....	22
2.1.5.3. Antioxidantes.....	24

2.1.5.4. Sistemas antioxidantes enzimáticos.....	24
2.1.5.5. Sistemas antioxidantes no enzimáticos.....	26
2.1.6. Actividad citotóxica.....	28
2.1.6.1. Citotoxicidad.....	28
2.1.6.2. <i>Artemia salina</i>	28
2.1.6.3. Concentración letal media (CL ₅₀).....	30
2.1.6.4. Bioensayo de letalidad en <i>Artemia salina</i>	31
III. METODOLOGÍA.....	32
3.1. Tipo de investigación.....	32
3.2. Diseño de la investigación.....	32
3.3. Materiales.....	33
3.3.1. Materiales, equipos y reactivos.....	33
3.3.2. Materiales biológicos.....	34
3.4. Ambiente de trabajo.....	34
3.5. Recolección y clasificación taxonómica.....	34
3.6. Estabilización, selección y secado.....	34
3.7. Preparación de los extractos hidroalcohólicos.....	35
3.8. Estudio fitoquímico.....	35
3.8.1. Marcha de solubilidad.....	35
3.8.2. Tamizaje fitoquímico.....	35
3.8.3. Cromatografía.....	36
3.8.4. Espectroscopía UV-Visible.....	36
3.8.5. Cuantificación de compuestos fenólicos totales.....	36
3.8.6. Cuantificación de flavonoides totales.....	38
3.9. Estudio biológico.....	39
3.9.1. Determinación de la actividad antioxidante.....	39
3.9.1.1. Método: Captación del radical 2,2-difenil-1- picrilhidrazil (DPPH).....	39
3.9.1.2. Método: Captación del radical ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín)-6 Sulfónico (ABTS ^{•+}).....	41
3.9.2. Determinación de la actividad citotóxica.....	43

4.0. Métodos estadísticos para el análisis de resultados.....	45
IV. RESULTADOS	46
4.1. Análisis preliminar de los extractos hidroalcohólicos.....	46
4.2. Marcha de solubilidad de los extractos hidroalcohólicos.....	46
4.3. Tamizaje fitoquímico de los extractos hidroalcohólicos.....	47
4.4. Análisis cromatográfico de los extractos hidroalcohólicos.....	48
4.4.1. Cromatografía en capa fina analítica.....	48
4.4.2. Cromatografía en capa fina preparativa.....	53
4.5. Espectroscopía UV-Visible.....	54
4.6. Cuantificación de compuestos fenólicos totales.....	58
4.7. Cuantificación de flavonoides totales.....	60
4.8. Actividad antioxidante.....	62
4.8.1. Actividad antioxidante empleando el radical DPPH.....	62
4.8.2. Actividad antioxidante empleando el radical ABTS ^{•+}	68
4.9. Actividad citotóxica: Bioensayo de citotoxicidad en <i>Artemia salina</i> (CYTED).....	74
V. DISCUSIÓN.....	81
VI. CONCLUSIONES.....	90
VII.RECOMENDACIONES	91
VIII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
IX. ANEXOS	103

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS^{•+}	: Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín)-6 Sulfónico
ANOVA	: Análisis de varianza del inglés Analysis of Variance
ATP	: Adenosín trifosfato
BHA	: Hidroxianisol butilado
BHT	: Hidroxitolueno butilado
CAT	: Catalasa
CL₅₀	: Concentración letal media
CO	: Ciclooxygenasa
CYTED	: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo
DE	: Desviación estándar
DMSO	: Dimetilsulfóxido
DPPH	: 2,2-difenil-1- picrilhidrazil
EAG	: Equivalentes de ácido gálico
EAT	: Equivalentes de ácido tánico
EQ	: Equivalentes de quercetina
ERO	: Especies reactivas de oxígeno
ERN	: Especies reactivas de nitrógeno
ES	: Extracto Seco
ET	: Equivalentes de Trolox
EtOH	: Etanol
FLA2	: Fosfolipasa A2
g	: Gramo
GPX	: Glutación peroxidasa
GSH	: Glutación en su forma reducida
H₂O₂	: Peróxido de hidrógeno
IC	: Intervalo de confianza
IC₅₀	: Concentración inhibitoria media
LO	: Lipoxigenasa

mm	: Milimetro
mL	: Mililitro
mS	: miliSiemens
MPO	: Mieloperoxidasa
NADPH	: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
nm	: Nanómetro
O₂	: Oxígeno molecular
*O₂	: Radical superóxido
¹O₂⁻	: Radical de oxígeno singlete
OH	: Grupo hidróxilo
OMS	: Organización Mundial de la Salud
ppm	: Partes por millón
RL	: Radical libre
SOD	: Superoxido dismutasa
TEAC	: Capacidad antioxidante equivalente a Trolox
UV	: Ultravioleta
µg	: Microgramo
λ	: Longitud de onda

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Distribución del género <i>Argemone</i> en América (área sombreada). Los números se refieren a las especies que se encuentran dentro del área del círculo.....	6
Figura 2.	Planta entera de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey.....	7
Figura 3.	Descripción botánica. (A) Hoja, (B) Flor, (C) Tallo, (D) Fruto, (E) Raíz.....	8
Figura 4.	Distribuciones geográficas del género <i>Argemone</i> en Sudamérica.....	9
Figura 5.	Estructura química de algunos alcaloides presentes en <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey.....	10
Figura 6.	Compuestos fenólicos. (A) El fenol es la estructura en la que se basa todo el grupo de compuestos fenólicos, (B) Estructura del ácido gálico.....	11
Figura 7.	Estructura básica de los flavonoides.....	14
Figura 8.	Características estructurales de los flavonoides: núcleo básico y ejemplos.....	15
Figura 9.	Clases de flavonoides: núcleo básico y ejemplos.....	16
Figura 10.	Clases de flavonoides, subclases y fuentes naturales.....	17
Figura 11.	Resumen de las relaciones estructura-actividad antioxidante.....	19
Figura 12.	Estructura química de la quercetina.....	20
Figura 13.	Estrés oxidativo: desequilibrio entre radicales libres y antioxidantes.....	21
Figura 14.	Enfermedades inducidas por estrés oxidativo en humanos.....	22
Figura 15.	Interacción de los radicales libres con biomoléculas.....	23
Figura 16.	Interacción de los radicales libres con antioxidantes.....	23
Figura 17.	Defensa antioxidantes de primera línea contra especies reactivas del oxígeno.....	26
Figura 18.	Ciclo de Vida de la <i>Artemia Salina</i>	29
Figura 19.	Eclosión del quiste y nauplio de <i>Artemia salina</i> . 1. Ojo naupliar, 2. Anténula, 3. Antena, 4. Mandíbula.....	30
Figura 20.	Esquema de la metodología empleado en los procedimientos experimentales.....	32

Figura 21.	Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu.....	37
Figura 22.	Complejo Flavonoide-Aluminio.....	38
Figura 23.	Reacción química entre el radical DPPH y la especie antioxidante.....	39
Figura 24.	Reacción química entre el radical ABTS ^{•+} y la especie antioxidante.....	41
Figura 25.	Cromatografía en capa fina analítica de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey (a).....	48
Figura 26.	Cromatografía en capa fina analítica de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey (b).....	49
Figura 27.	Cromatografía en capa fina analítica del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey.....	50
Figura 28.	Cromatografía en capa fina analítica del extracto hidroalcohólico de tallo de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey.....	51
Figura 29.	Cromatografía en capa fina analítica del extracto hidroalcohólico de raíz de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey.....	52
Figura 30.	Cromatografía en capa fina preparativa de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey.....	53
Figura 31.	Espectro de absorción de la Fracción 7 del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey (a).....	54
Figura 32.	Espectro de absorción de la Fracción 11 del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey (b).....	55
Figura 33.	Espectro de absorción de la Fracción 6 del extracto hidroalcohólico de tallo de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey (a).....	55
Figura 34.	Espectro de absorción de la Fracción 9 del extracto hidroalcohólico de tallo de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey (b).....	56
Figura 35.	Espectro de absorción de la Fracción 2 del extracto hidroalcohólico de raíz de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey (a).....	56

Figura 36.	Espectro de absorción de la Fracción 5 del extracto hidroalcohólico de raíz de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey (b).....	57
Figura 37.	Espectro de absorción de la Fracción 6 del extracto hidroalcohólico de raíz de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey (c).....	57
Figura 38.	Curva de calibración concentración-absorbancia del ácido gálico para la cuantificación de compuestos fenólicos totales ($R^2=0.9992$).....	58
Figura 39.	Comparativo del contenido de compuestos fenólicos totales en cada extracto hidroalcohólico de hojas, tallo y raíz de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey.....	61
Figura 40.	Comparativo del contenido de flavonoides totales en cada extracto hidroalcohólico de hojas, tallo y raíz de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey.....	61
Figura 41.	Curva concentración-absorbancia del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey ($R^2=0.9973$).....	62
Figura 42.	Curva concentración-absorbancia del extracto hidroalcohólico de tallo de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey ($R^2=0.9968$).....	63
Figura 43.	Curva concentración-absorbancia del extracto hidroalcohólico de raíz de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey ($R^2=0.9999$).....	64
Figura 44.	Curva de calibración concentración-absorbancia para la solución patrón Trolox-DPPH ($R^2=0.999$).....	65
Figura 45.	Comparativo de IC_{50} de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey por el método DPPH.....	67
Figura 46.	Comparativo de TEAC de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey por el método DPPH.....	67
Figura 47.	Curva concentración-absorbancia para el extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey ($R^2=0.9971$).....	68
Figura 48.	Curva concentración-absorbancia para el extracto hidroalcohólico de tallo de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey ($R^2=0.9967$).....	69

Figura 49.	Curva concentración-absorbancia para el extracto hidroalcohólico de raíz de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey ($R^2=0.9981$).....	70
Figura 50.	Curva de calibración concentración-absorbancia para la solución patrón Trolox-ABTS ⁺ ($R^2=0.9999$).....	71
Figura 51.	Comparativo de IC ₅₀ de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey por el método ABTS ⁺	73
Figura 52.	Comparativo de TEAC de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey por el método ABTS ⁺	73
Figura 53.	Comparativo de <i>Artemia salina</i> muertas en el extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey.....	74
Figura 54.	Comparativo de <i>Artemia salina</i> muertas en el extracto hidroalcohólico de tallo de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey.....	76
Figura 55.	Comparativo de <i>Artemia salina</i> muertas en el extracto hidroalcohólico de raíz de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey.....	78
Figura 56.	Comparativo de CL ₅₀ de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey por el método del bioensayo de <i>Artemia salina</i>	80

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Clasificación de los compuestos fenólicos.....	12
Tabla 2.	Estructuras de los ácidos fenólicos.....	13
Tabla 3.	Antioxidantes enzimáticos.....	25
Tabla 4.	Función de antioxidantes no enzimáticos.....	27
Tabla 5.	Cantidades de materia prima vegetal y solvente (etanol 96 ^o) empleados en el proceso de extracción por el método de maceración.....	35
Tabla 6.	Clasificación de la actividad antioxidante según los valores de IC ₅₀	43
Tabla 7.	Clasificación de toxicidad según CYTED.....	45
Tabla 8.	Propiedades físicas, gramos del extracto seco y rendimiento de los extractos hidroalcohólicos de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey.....	46
Tabla 9.	Marcha de solubilidad de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey.....	46
Tabla 10.	Tamizaje fitoquímico de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey.....	47
Tabla 11.	Absorbancias promedio del estándar de ácido gálico a 765 nm...	58
Tabla 12.	Absorbancia promedio de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey a 765 nm.....	59
Tabla 13.	Contenido de compuestos fenólicos totales en cada extracto hidroalcohólico de hojas, tallo y raíz de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey.....	59
Tabla 14.	Absorbancias promedio de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey y el estándar de quercetina a 432 nm.....	60
Tabla 15.	Contenido de flavonoides totales en cada extracto hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey.....	60
Tabla 16.	Absorbancias promedio y porcentaje de Inhibición de radicales libres del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Argemone</i> <i>subfusiformis</i> G.B. Ownbey.....	62

Tabla 17.	Absorbancias promedio y porcentaje de Inhibición de radicales libres del extracto hidroalcohólico de tallo de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey.....	63
Tabla 18.	Absorbancias promedio y porcentaje de Inhibición de radicales libres del extracto hidroalcohólico de raíz de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey.....	64
Tabla 19.	Absorbancias promedio y porcentaje de Inhibición de radicales libres de la solución patrón Trolox por el método DPPH.....	65
Tabla 20.	Cuadro comparativo de IC ₅₀ y TEAC de los extractos hidroalcohólicos de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey.....	66
Tabla 21.	Absorbancias promedio y porcentaje de Inhibición de radicales libres del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey.....	68
Tabla 22.	Absorbancias promedio y porcentaje de Inhibición de radicales libres del extracto hidroalcohólico de tallo de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey.....	69
Tabla 23.	Absorbancias promedio y porcentaje de Inhibición de radicales libres del extracto hidroalcohólico de raíz de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey.....	70
Tabla 24.	Absorbancias promedio y porcentaje de Inhibición de radicales libres de la solución patrón Trolox por el método ABTS ⁺⁺	71
Tabla 25.	Cuadro comparativo de IC ₅₀ y TEAC de los extractos hidroalcohólicos de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey.....	72
Tabla 26.	Registro de <i>Artemia salina</i> muertas a las 24 horas de exposición al extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey.....	74
Tabla 27.	Concentración letal media (CL ₅₀) sobre <i>Artemia salina</i> a las 24 horas de exposición al extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey en el modelo PROBIT SPSS versión 24.....	75
Tabla 28.	Registro de <i>Artemia salina</i> muertas a las 24 horas de exposición al extracto hidroalcohólico de tallo de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey.....	76

Tabla 29.	Concentración letal media (CL ₅₀) sobre <i>Artemia salina</i> a las 24 horas de exposición al extracto hidroalcohólico de tallo de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey en el modelo PROBIT SPSS versión 24.....	77
Tabla 30.	Registro de <i>Artemia salina</i> muertas a las 24 horas de exposición al extracto hidroalcohólico de raíz de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey a las 24 horas.....	78
Tabla 31.	Concentración letal media (CL ₅₀) sobre <i>Artemia salina</i> a las 24 horas de exposición al extracto hidroalcohólico de raíz de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey en el modelo PROBIT SPSS versión 24.....	79

RESUMEN

La presente tesis muestra una investigación comparativa que evaluó las actividades antioxidante y citotóxica de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey “Cardo santo”. El contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales se cuantificarón por los métodos de Folin-Ciocalteu y tricloruro de aluminio (AlCl_3) respectivamente. La actividad antioxidante se evaluó por los métodos de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) y ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín)-6 Sulfónico ($\text{ABTS}^{\bullet+}$); la actividad citotóxica se evaluó mediante el bioensayo de citotoxicidad en *Artemia salina* (CYTED). Los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz en la prueba de DPPH presentaron una concentración inhibitoria media (IC_{50}) de $497.52 \pm 1.21 \mu\text{g/mL}$, $330.48 \pm 1.09 \mu\text{g/mL}$ y $1017.83 \pm 3.11 \mu\text{g/mL}$ respectivamente; para la prueba de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ presentaron un IC_{50} de $181.27 \pm 0.84 \mu\text{g/mL}$, $136.70 \pm 0.24 \mu\text{g/mL}$ y $341.60 \pm 0.95 \mu\text{g/mL}$ respectivamente. En relación a la concentración letal media (CL_{50}) de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz estos fueron de $552.868 \mu\text{g/mL}$, $562.790 \mu\text{g/mL}$ y $578.515 \mu\text{g/mL}$ respectivamente. Por lo tanto, se concluye que el tallo presenta un mayor potencial antioxidante en comparación con las hojas y raíz; asimismo, los tres órganos presentaron ligera actividad citotóxica.

Palabras clave: *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey “Cardo santo”, compuestos fenólicos, flavonoides, antioxidante, *Artemia salina*, citotóxica.

SUMMARY

This thesis shows a comparative investigation that evaluated the antioxidant and cytotoxic activities of the hydroalcoholic extracts of leaves, stem and root of *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey "Cardo santo". The content of phenolic compounds total and flavonoids total were quantified by the methods of Folin-Ciocalteu and aluminum trichloride (AlCl_3) respectively. The antioxidant activity was evaluated using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) method and 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazolin)-6 sulfonic acid (ABTS^{++}) method; in addition, cytotoxic activity was evaluated by the cytotoxicity bioassay in brine shrimp (CYTED). The hydroalcoholic extracts of leaves, stem and root in the DPPH test had a mean inhibitory concentration (IC_{50}) of $497.52 \pm 1.21 \mu\text{g/mL}$, $330.48 \pm 1.09 \mu\text{g/mL}$ and $1017.83 \pm 3.11 \mu\text{g/mL}$ respectively; for the ABTS^{++} test presented an IC_{50} of $181.27 \pm 0.84 \mu\text{g/mL}$, $136.70 \pm 0.24 \mu\text{g/mL}$ and $341.60 \pm 0.95 \mu\text{g/mL}$ respectively. In relation to the mean lethal concentration (LC_{50}) of the hydroalcoholic extracts of leaves, stem and root, these were $552.868 \mu\text{g mL}$, $562.790 \mu\text{g/mL}$ and $578.515 \mu\text{g/mL}$ respectively. Therefore it is concluded that the stem has a greater antioxidant potential compared to the leaves and roots; also, the three bodies had slight cytotoxic activity.

Keywords: *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey "Cardo santo", phenolic compounds, flavonoids, antioxidant, brine shrimp, cytotoxic.

I. INTRODUCCIÓN

La práctica de la medicina herbaria se fundamenta en el uso terapéutico de las plantas medicinales como sustitutas de medicinas farmacéuticas o en combinación. De las plantas se utilizan extractos en diversas formas de preparación, para mejorar la salud. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), los medicamentos herbarios abarcan: hierbas, material herbario, preparaciones herbarias y productos herbarios terminados, que contienen como principios activos órganos de las especies vegetales y otras partes de la planta fragmentada, pulverizada y/o combinaciones de estos elementos¹. El Perú posee un acervo inigualable en materia de conocimientos ancestrales relacionados al diagnóstico y tratamiento de la salud, estos conocimientos son practicados por gran parte de la población del país, en todas sus regiones².

Las propiedades medicinales de las plantas eran difíciles de explicar hasta que los estudios científicos justificaron la presencia de moléculas biológicamente activas: metabolitos secundarios. En las plantas medicinales, los metabolitos secundarios que destacan son flavonoides y antocianinas que presentan propiedades farmacológicas; los taninos son polifenoles hidrosolubles; los alcaloides son sustancias orgánicas de origen vegetal con actividad fisiológica muy intensa en pequeñas dosis³.

Los antioxidantes presentes en las especies vegetales han cobrado gran interés en las últimas dos décadas debido a que el estrés oxidativo está implicado en gran número de problemas de salud. Se ha demostrado que el daño oxidativo causado por los radicales libres está relacionado con una amplia gama de enfermedades y desordenes que incluyen: fallo cardíaco, inflamaciones, cataratas y daños, entre otros⁴.

La creciente importancia terapéutica de los antioxidantes y sus efectos secundarios reportados para algunos antioxidantes sintéticos, por ejemplo, el hidroxianisol butilado (BHA) o el hidroxitolueno butilado (BHT) han motivado investigaciones de nuevas alternativas de moléculas con gran eficacia para captar radicales libres⁵.

La actividad antioxidante de las plantas está asociadas a la presencia y al contenido de compuestos fenólicos, los cuales son potentes secuestradores de especies reactivas de oxígeno y capaces de inhibir a enzimas productoras de radicales libres⁶.

En las investigaciones respecto a las propiedades antioxidantes de las especies vegetales, un punto importante es evaluar la actividad citotóxica de sus productos derivados, ya que se han convertido en un método de uso muy frecuente en los últimos años; como parte de un largo y laborioso proceso de evaluación y desarrollo de un fitofármaco o de un nuevo medicamento⁷. Se han venido desarrollando bioensayos para determinar su citotoxicidad como el ensayo en *Artemia salina*; que se utilizan como vía inicial de tamizaje citotóxico de extractos y fracciones, con el fin de discriminar muestras con elevada toxicidad⁸. Por lo expuesto, se requiere dotar de base científica al uso terapéutico de plantas medicinales a través de estudios que comprueben su efectividad biológica y nivel de toxicidad⁵.

Una especie vegetal con gran aplicación terapéutica en nuestro país es *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey, es nativa de América, llamada comúnmente “Cardo santo”, esta es una especie que presenta numerosas propiedades medicinales. Entre sus propiedades destacan las cicatrizantes, dermatopáticas, oftálmicas, purgantes, eméticas, emolientes, antiasmática entre otras. Por otro lado, es una planta que se caracteriza por que contiene polisacáridos, compuestos fenólicos, algunos alcaloides como la berberina y sanguinarina^{9, 10}.

Por lo expuesto, las especies vegetales son un importante punto de partida en la búsqueda de potenciales moléculas con actividad antioxidante y citotóxica⁵. En este estudio, se evaluó la capacidad antioxidante y citotóxica de tres órganos de la planta (hojas, tallo y raíz) de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey “Cardo santo”, la cual fue colectada en Moro-Ancash, este estudio permitirá contribuir con la búsqueda de alternativas naturales que proporcionen constituyentes químicos capaces de reducir y prevenir los riesgos de enfermedades.

1.1. Hipótesis

- Los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey “Cardo santo” presentan actividad antioxidante y citotóxica.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

- Evaluar la actividad antioxidante y citotóxica de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey “Cardo santo”.

1.2.2. Objetivos específicos

1. Cuantificar los compuestos fenólicos totales de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey “Cardo santo.”
2. Cuantificar flavonoides totales de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey “Cardo santo” y determinar algunas estructuras de flavonoides.
3. Determinar la capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey “Cardo santo.”
4. Determinar la actividad citotóxica de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey “Cardo santo.”

II. GENERALIDADES

2.1. Marco teórico

2.1.1. Familia Papaveraceae

Las especies de la familia Papaveraceae se caracterizan por ser especies herbáceas, a veces leñosas, provistas de látex transparente, blanquecino, blanco, amarillo, amarillo-anaranjado o rojizo. Hojas simples, usualmente alternas, a menudo algunas o todas dispuestas en roseta basal, enteras a profundamente partidas; estípulas ausentes; láminas enteras, a menudo pinnatilobadas, pinnatífidas o pinnatipartidas, a veces espinosas, con venación pinnada. Inflorescencias preferentemente racimosas, cimas, umbelas o flores solitarias, rara vez panículas; brácteas foliáceas, 1 o 2^{11, 12, 13}. Flores hermafroditas, actinomorfas o zigomorfas; sépalos 2 o 3, libres, ocasionalmente connados con tendencia a la asimetría, imbricados, deciduos; pétalos 4 a 6, a veces numerosos, libres, a menudo diferenciados en 2 o 3 series, deciduos, raramente ausentes; estambres numerosos, de 4 a 6, libres, anteras bitecas, basifijas, con dehiscencia longitudinal; gineceo de 2 o más carpelos unidos, ovario sésil o estipitado, súpero, unilocular, placentación parietal, a veces placentas intrusivas simulando septos parciales o incompletos, en ocasiones el ovario parece plurilocular con placentación axial; óvulos numerosos, a veces sólo 1 fértil, anátropos a anfítropos o campílotropos, bitégmicos, crasinucelares, estilo con frecuencia ausente o deciduo, estigma discoide, lobado, capitado o bífido. Frutos capsulares, con o sin espinas, estipitados o sésiles, dehiscencia valvar, longitudinal o poricida apical, rara vez indehiscentes, generalmente con repleo o septo engrosado, persistente después de la dehiscencia del fruto y desarrollado a partir de la placenta. Semillas solitarias o numerosas, a veces ariladas, de formas variables, reticuladas, endospermo nuclear, aceitoso¹⁴.

La familia Papaveraceae está distribuida en las zonas templadas y subtropicales, especialmente diversa en el hemisferio norte, en el sureste de África y este de Australia¹⁴. Esta familia consta de 44 géneros con unas 760 especies. La familia Papaveraceae tiene géneros importantes como *Corydalis*, *Papaver*, *Fumaria* y *Argemone*¹², algunos géneros tienen especies de importancia económica; por ejemplo,

Papaver somniferum es la principal fuente de opio y sus derivados como: morfina y codeína; en la medicina tradicional son muy utilizadas algunas especies de *Bocconia* y *Argemone*; la presencia de flores vistosas en algunas especies de *Argemone*, *Papaver* y *Eschscholzia* propician su cultivo como ornamentales¹⁴.

2.1.2. Género Argemone

Son plantas herbáceas, anuales o bienales, raramente vivaces, erectas, ramosas, espinosas, verde-azulosas, con látex transparente, blanquecino, amarillento, amarillo-anaranjado o rojizo. Hojas basales rosuladas y caulinares alternas, sésiles o amplexicaules; láminas glaucas o verde-azulosas, lanceoladas a elípticas en contorno general, lobadas o divididas, a veces con manchas de un tono distinto a lo largo de la vena principal, margen dentado, cada diente con una espina en el ápice. Flores actinomorfas, vistosas; botones oblongos a subglobosos; sépalos 2 o 3, inermes o espinosos, deciduos, el ápice alargado en forma de cuerno que termina en una espina; pétalos 6, en 2 verticilos de 3, blancos, amarillentos o amarillo-anaranjados, deciduos, los exteriores más anchos que los interiores; estambres numerosos, más de 20, anteras lineares; gineceo de 3 a 5 carpelos, ovario sésil, con 3 a 7 placentas, óvulos numerosos, estilo ausente, estigma 3 a 5-lobado. Frutos elipsoides o fusiformes, con o sin espinas, dehiscentes por 3 a 7 valvas apicales. Semillas negras, numerosas, elipsoidales, globosas o subglobosas, apiculadas, reticuladas, sin arilo^{14, 15}.

Argemone es un género de *Papaveraceae* cuyas especies, son nativas de las Américas. Este género tiene de 28 a 30 especies, distribuidas en América e introducidas en todo el mundo^{16, 17} (Figura 1).

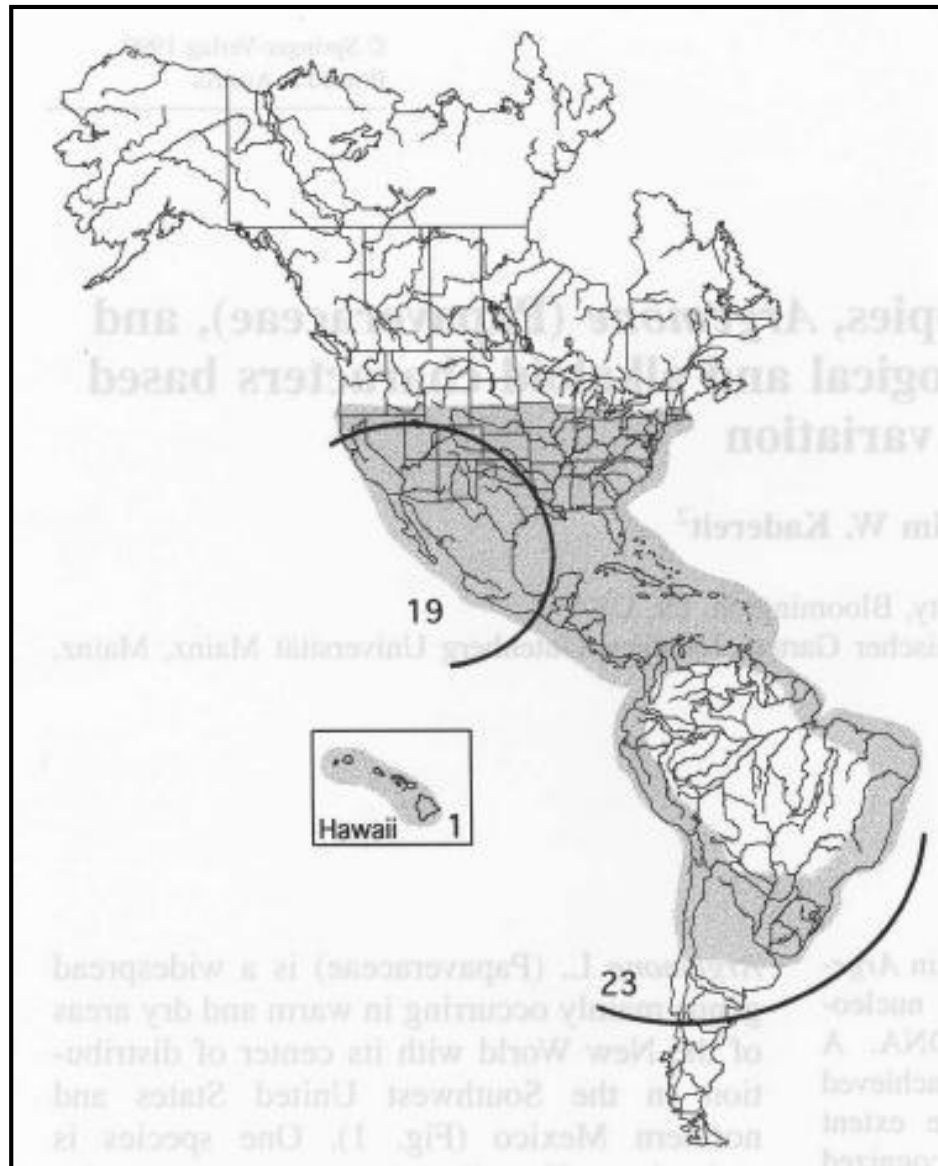


Figura 1. Distribución del género *Argemone* en América (área sombreada). Los números se refieren a las especies que se encuentran dentro del área del círculo¹⁷.

2.1.3. Aspectos botánicos de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey

2.1.3.1. Taxonomía

La especie *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey fue clasificada taxonómicamente, según el sistema de clasificación de Cronquist (1981), en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Figura 2, Anexo N°1):

DIVISIÓN	: Magnoliophyta
CLASE	: Magnoliopsida
SUBCLASE	: Magnoliidae
ORDEN	: Papaverales
FAMILIA	: Papaveraceae
GÉNERO	: <i>Argemone</i>
ESPECIE	: <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey

Nombre vulgar: “Cardo santo”



Figura 2. Planta entera de *Argemone Subfusiformis* G.B. Ownbey.
Fuente: propia.

2.1.3.2. Descripción botánica

Argemone subfusiformis G.B. Ownbey, es de la familia de las Papaveráceas, hierba anual, glauca, laticífera, totalmente espinosa, de nombre vulgar “Cardo santo” o “Cardo blanco”. **Tallos:** erguidos con látex amarillento, ramificados de 25-100 cm de altura. **Fruto:** cápsulas espinosas, oblonga, de 4-5 cm de largo, dehiscentes por valvas apicales. **Hojas:** manchadas de blanco, glaucas, alternas, oblanceoladas, angostas, abrazadoras en la base, dentadas. Las nervaduras medias y secundarias del envés espinoso miden 10-25 cm longitud por 3-10 cm de ancho. **Inflorescencia:** flores grandes, solitarias y terminales. **Semillas:** Numerosas, esféricas u ovoides, pardo negruzcas de 2-2,5 mm de largo, con depresiones angulosas y cresta irregular lateral. **Flores:** 2- 8 cm de diámetro, corola con 4-6 pétalos de color amarillo claro o blanquecino, cuneiforme o semiorbicular, estambres numerosos y libres, filamentos y anteras amarillos. Cápsulas con 3-4 hojas carpelares¹⁸ (Figura 3).

Argemone subfusiformis G.B. Ownbey se distingue de *Argemone mexicana* L. por las yemas oblongas, los apéndices corniculados de los sépalos, las flores son más grandes con pétalos amarillos muy pálidos y por las cápsulas notablemente más alargadas y fusiformes¹⁸.

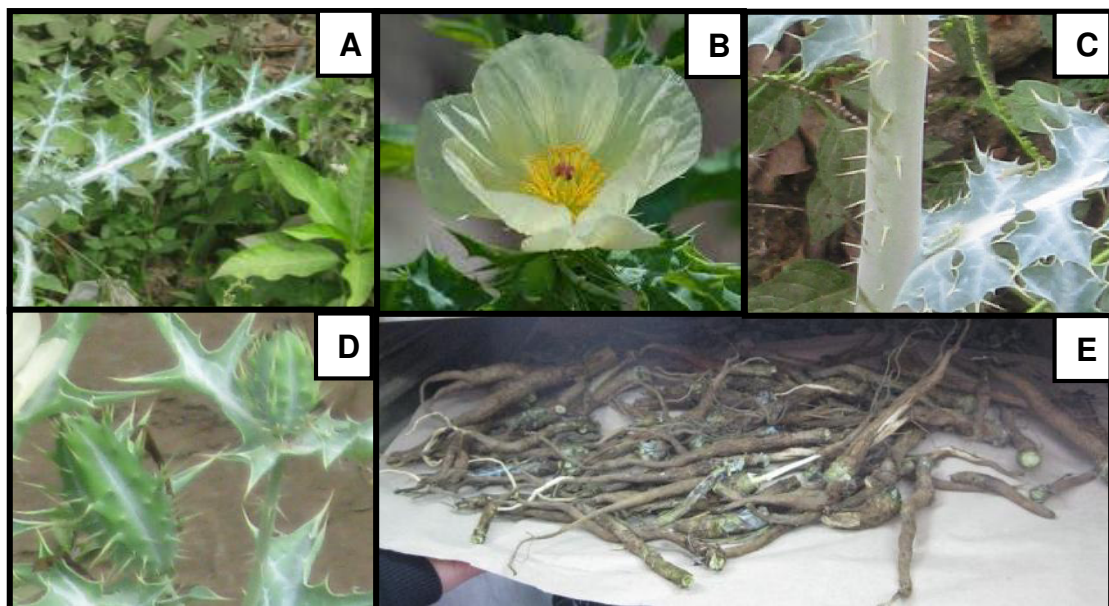


Figura 3. Descripción botánica. (A) Hoja, (B) Flor, (C) Tallo, (D) Fruto, (E) Raíz.
Fuente: propia.

2.1.3.3. Distribución geográfica

Argemone subfusiformis G.B. Ownbey es el Argemone común de flores amarillas de Argentina, Bolivia, Chile, Perú y Ecuador. Probablemente no sea posible a la fecha determinar qué parte de esta extensa gama representa su área natural. Ciertamente, ha sido llevado de un lugar a otro por el hombre debido a sus propiedades medicinales y por esta razón su presencia en muchos lugares es directamente atribuible a él. Altitudinalmente, su distribución es bastante notable, desde cerca del nivel del mar en áreas costeras hasta más de 11,000 pies en Perú¹⁶. En Sudamérica: Ecuador, Perú, Paraguay, Bolivia, Chile y en la Argentina ampliamente distribuida desde el Norte hasta la Patagonia¹⁹ (Figura 4).

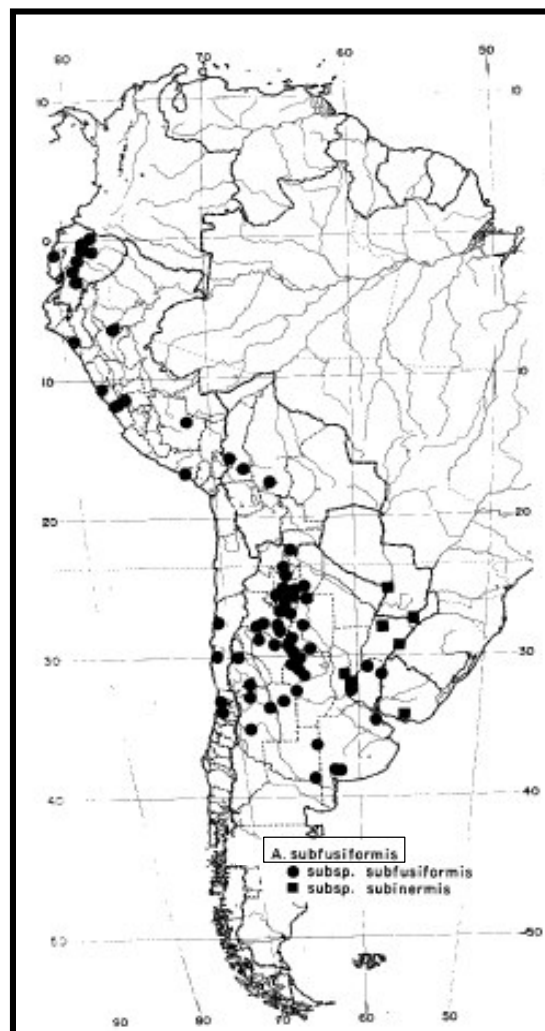


Figura 4. Distribuciones geográficas del género Argemone en Sudamérica. Especie *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey¹⁶.

2.1.3.4. Composición química

Argemone subfusiformis G.B. Ownbey se caracteriza por tener abundante látex, el cual es rico en polisacáridos y polifenoles. Se han detectado aminoácidos, fenoles, ácidos grasos y alcaloides altamente tóxicos¹⁰. Los alcaloides presentes en *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey son berberina, protopina, sanguinarina y tres bases sin identificación^{20, 21} (Figura 5).

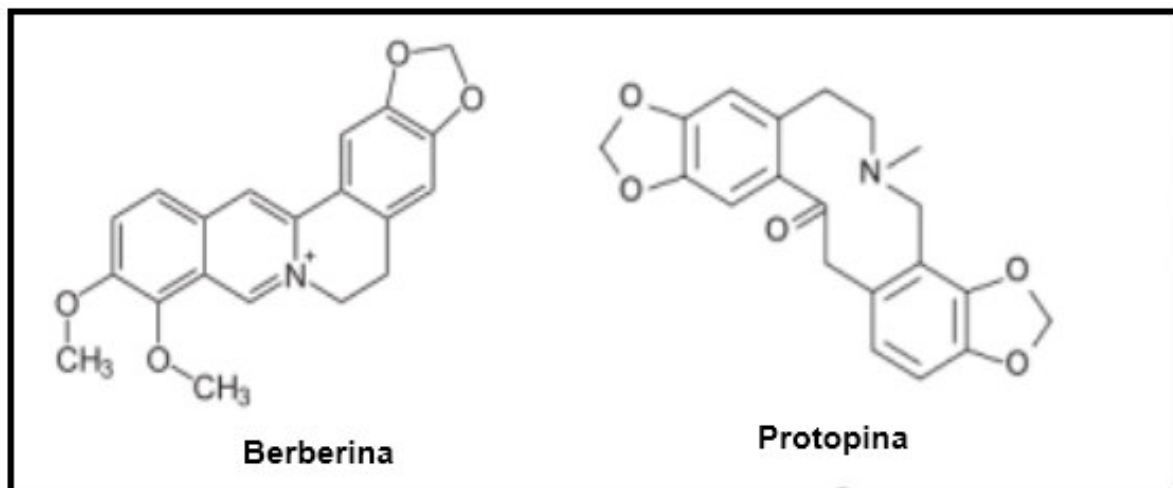


Figura 5. Estructura química de algunos alcaloides presentes en *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey²¹.

2.1.3.5. Propiedades medicinales

Si bien la planta es tóxica, posee importantes cualidades medicinales reconocidas: se utiliza el látex de la planta para el tratamiento de cataratas y nubes en ojos. Las hojas presentan propiedades antiulcerantes, cicatrizantes, dermatopáticas, hipnóticas, narcóticas, oftálmicas, para aliviar el dolor de estómago, sedantes y tratamiento de heridas externas; la decocción de hojas posee actividad sedante, disminuye la tensión arterial, relajante muscular y antiarrítmica. Sus raíces son eméticas y purgantes; la flor tiene propiedades emolientes y pectorales; la infusión de pétalos es empleada como antiasmática y digestiva. Las semillas se utilizan como diaforéticas y febrífugas^{10, 22}.

2.1.4. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos comprenden una de las familias más numerosas y ampliamente distribuidas en el reino vegetal. En general, se forman principalmente en considerables cantidades como productos secundarios del metabolismo de las plantas^{23, 24}. Son estudiados frecuentemente por sus diversas acciones como: asimilar nutrientes, síntesis proteica, actividad enzimática, fotosíntesis, compuestos estructurales y defensa ante factores adversos del ambiente. Estos son reconocidos por su remarcada capacidad antioxidante²⁵. Forman parte de un grupo muy heterogéneo que comprende desde moléculas sencillas como el ácido gálico (ácido fenólico), hasta compuestos muy polimerizados, como taninos. En cuanto a su estructura, poseen un anillo aromático (C₆) en común, con uno o más grupos hidroxilo²⁴ (Figura 6)

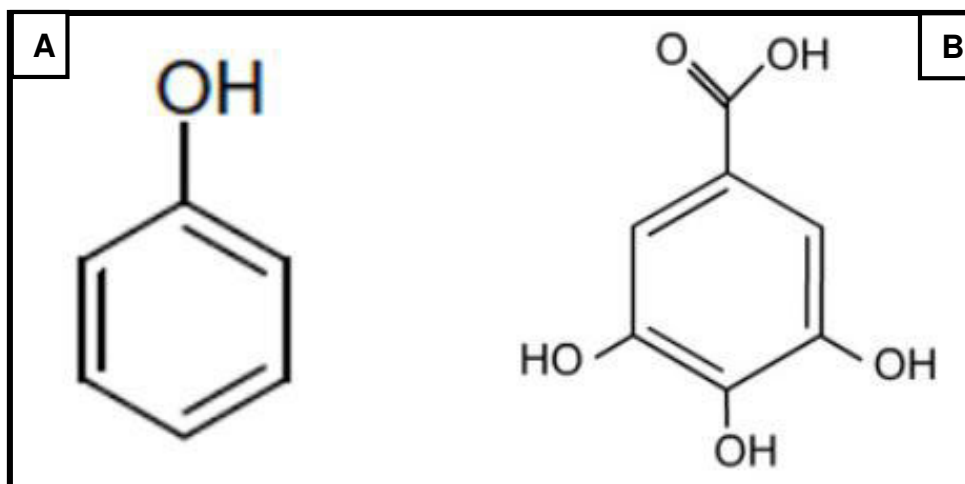


Figura 6. Compuestos fenólicos. **(A)** El fenol es la estructura en la que se basa todo el grupo de compuestos fenólicos, **(B)** Estructura del ácido gálico²³.

Estos compuestos pueden clasificarse en varios grupos, de acuerdo con su estructura química básica, siendo los principales grupos: ácidos fenólicos, flavonoides, taninos hidrolizables, taninos condensados, estilbenos y lignanos^{24, 25} (Tabla 1).

Tabla 1. Principales compuestos fenólicos: estructura y clasificación

Nº de átomos de carbono	Estructura	Clase
6	C ₆	Fenoles
7	C ₆ -C ₁	Ácidos fenólicos
8	C ₆ -C ₂	Ácidos fenilacéticos
9	C ₆ -C ₃	Fenilpropanoides, Cumarinas, Isocumarinas
10	C ₆ -C ₄	Naftoquinonas
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Xantonas
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Antraquinonas
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoides
18	[C ₆ -C ₃] ₂	Lignanós
30	[C ₆ -C ₃ -C ₆] ₂	Bioflavonoides
n	[C ₆ -C ₃ -C ₆] _n	Taninos
n	[C ₆ -C ₃] _n	Ligninas

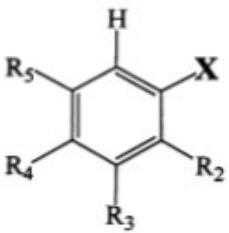
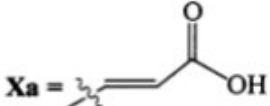
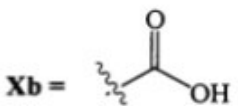
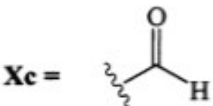
Fuente: Altamirano J.²⁶

2.1.4.1. Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos constituyen una subclase de categoría fenólica, presentes en especies vegetales como ésteres o glicósidos conjugados con otros compuestos naturales tipo flavonoides, alcoholes, esteroides y glucósidos. En las plantas se han asociado con diversas funciones: absorción de nutrientes, síntesis de proteínas, actividad enzimática, fotosíntesis, componentes estructurales y alelopatía²⁷. Los ácidos fenólicos (ácidos fenolcarboxílicos) son fenoles que incluyen sustancias que contienen un anillo fenólico y al menos una función orgánica de ácido carboxílico. Dependiendo de las unidades de carbono de la cadena lateral unida al anillo fenólico, los ácidos fenólicos se pueden dividir en compuestos C₆-C₃, C₆-C₂ y C₆-C₁, siendo el más importante C₆-C₃ (derivado del ácido hidroxicinámico) y C₆-C₁ (compuestos con una estructura hidroxibenzoica)²⁸ (Tabla 2). La actividad antioxidante de las plantas se debe al contenido de ácido fenólico, especialmente al cafeico y p-cumárico. La mayor actividad antioxidante del ácido cafeico proviene de la posición 3,4 de la dihidroxilación en el anillo fenólico. Aunque la naturaleza exacta de los efectos antioxidantes o protectores *in vivo* no está bien establecida, se han llevado a cabo algunas investigaciones preliminares. Los ácidos cafeico, ferúlico, cloragénico y sinápico han

mostrado efectos antioxidantes o protectores *in vivo* por varios mecanismos. Se cree que el modo predominante es la captura de radicales a través de donación de átomos de hidrógeno, mecanismos de extinción de radicales mediante donación de electrones y extinción de oxígeno^{27, 28}.

Tabla 2. Estructuras de los ácidos fenólicos

						
						
R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	X	Código	Nombre común
H	H	H	H	a	1	Ácido cinámico
-OH	H	H	H	a	2	Ácido o-cumárico
H	H	-OH	H	a	3	Ácido p-cumárico
H	-OH	H	H	a	4	Ácido m-cumárico
H	-OCH ₃	-OH	H	a	5	Ácido ferúlico
H	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	a	6	Ácido sinápico
H	-OH	-OH	H	a	7	Ácido cafeico
H	H	H	H	b	8	Ácido benzoico
-OH	H	H	H	b	9	Ácido salicílico
H	H	-OH	H	b	10	Ácido p-hidroxibenzoico
H	-OCH ₃	-OH	H	b	11	Ácido vanílico
H	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	b	12	Ácido siringico
H	-OH	-OH	H	b	13	Ácido protocatechuico
-OH	H	H	-OH	b	14	Ácido gentísico
-OH	-OH	-OH	-OH	b	15	Ácido gálico
H	-OCH ₃	-OCH ₃	H	b	16	Ácido veratrico
H	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	c	17	Siringaldehído
H	-OCH ₃	-OH	H	c	18	Vanilina

Fuente: Robbins R.²⁸

2.1.4.2. Flavonoides

Los flavonoides son una clase importante de productos naturales; en particular, pertenecen a una clase de metabolitos secundarios de plantas que tienen una estructura polifenólica, tienen diversos efectos bioquímicos y antioxidantes favorables asociados con diversas enfermedades como Alzheimer, aterosclerosis, cáncer, entre

otros. Los flavonoides están asociados con un amplio espectro de efectos que promueven la salud y son componentes indispensables en gran variedad de aplicaciones farmacéuticas, medicinales y cosméticos; debido a sus propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias, antimutagénicas, antioxidantes y su capacidad para modular funciones clave de las enzimas celulares²⁹. Los flavonoides son muy importantes para el desarrollo y buen funcionamiento de las especies vegetales, ya que actúan como agentes protectores contra la luz UV e infecciones por organismos fitopatógenos; además de presentar propiedades relacionadas con la salud humana: actividad antioxidante³⁰. El organismo humano es incapaz de elaborar estas sustancias químicas protectoras, por lo que se debe adquirir con la alimentación y/o en suplementos³¹.

- **Estructura química**

Los flavonoides poseen en un esqueleto de quince carbonos: dos anillos de benceno (A y B) unidos a través de un anillo pirano (C), con estructura general $C_6-C_3-C_6$. En los anillos A y C los átomos de carbono se enumeran de 2 al 8, y desde el 2' al 6' en el anillo B³² (Figura 7). Su estructura deriva de la γ -cromona (o benzo- γ -pirona) con un fenilo en posición 2. De los tres anillos, el anillo A se origina a través de la ruta de los policétidos; el anillo B y la unidad C_3 (que forma el anillo C) proceden de la ruta del ácido shikímico. Los flavonoides tienen el anillo aromático hidroxilado y, por tanto, son polifenólicos. En la posición 4 poseen un carbonilo y las variaciones se producen en las posiciones 1, 2 y 3 de la unidad C_3 y en el anillo B³³.

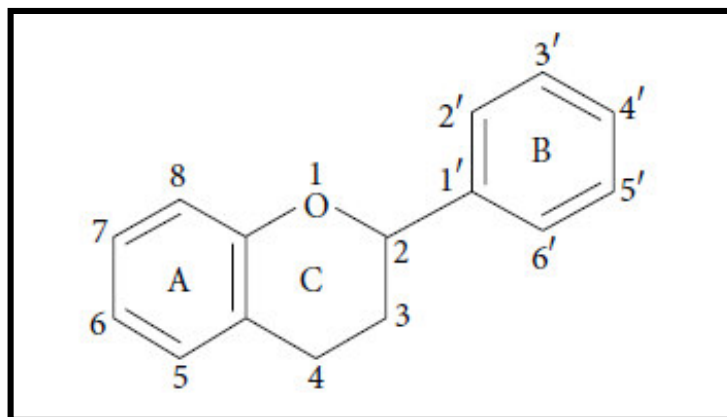


Figura 7. Estructura básica de los flavonoides³².

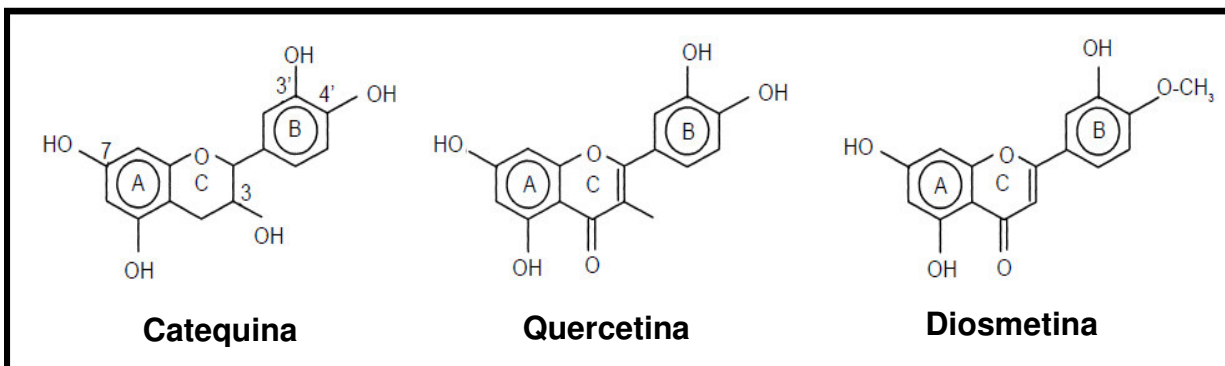


Figura 8. Características estructurales de los flavonoides: núcleo básico y ejemplos³¹.

Poseen en su estructura tres características que son importantes para su función³¹ (Figura 8):

1. En el anillo B la presencia de la estructura catecol u O-dihidroxi.
2. En la posición 2,3 la presencia de un doble enlace.
3. En la posición 3 y 5 la presencia de grupos hidroxilo.

• **Clasificación**

Los flavonoides se pueden subdividir en diferentes subgrupos según el carbono del anillo C en el que se une el anillo B y el grado de insaturación y oxidación del anillo C. Los flavonoides en los que el anillo B está vinculado en la posición 3 del anillo C se denominan isoflavonas. Aquellos en los que el anillo B está vinculado en la posición 4 se denominan neoflavonoides, mientras que aquellos en los que el anillo B está vinculado en la posición 2 pueden subdividirse en varios subgrupos en función de las características estructurales del anillo C. Estos subgrupos son: flavonas, flavonoles, flavanonas, flavononoles, flavanoles o catequinas, antocianinas y chalconas²⁹ (Figura 9).

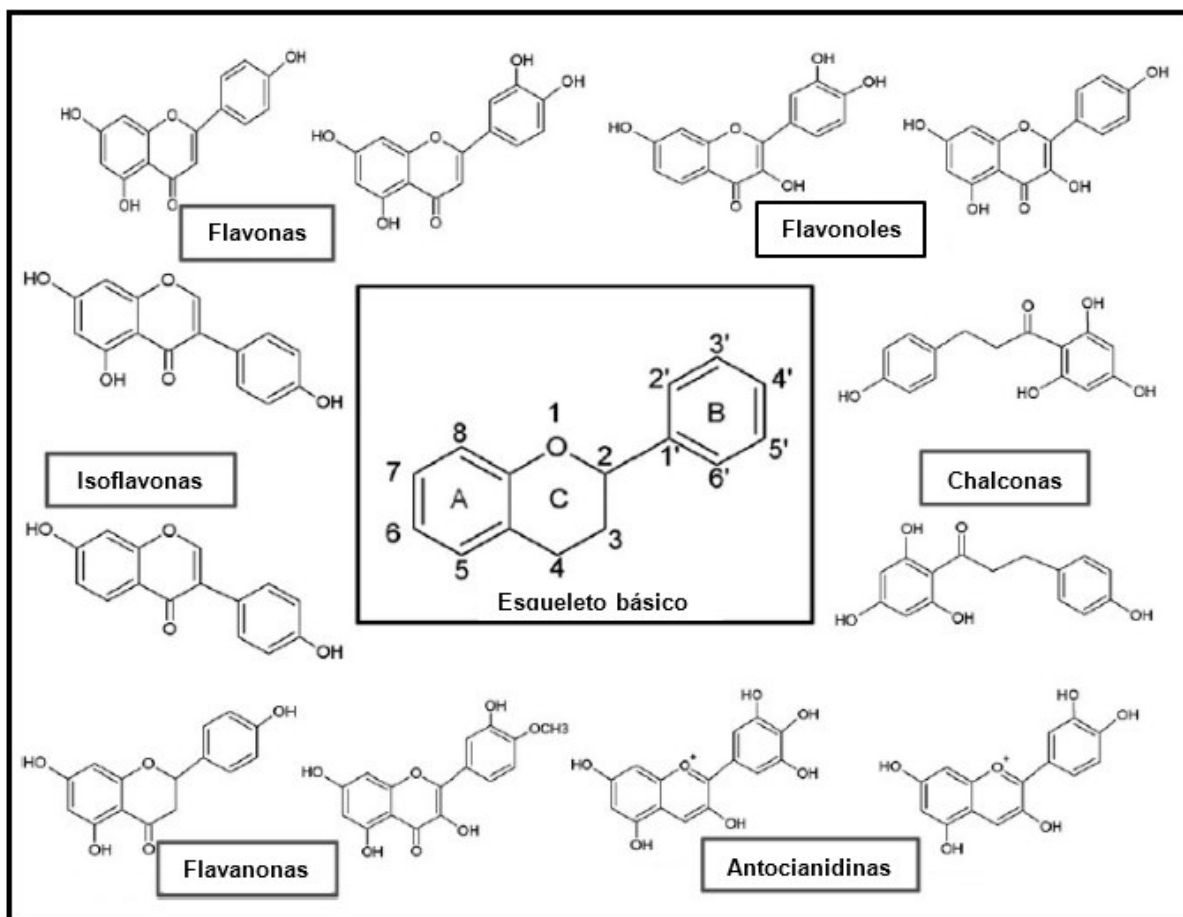


Figura 9. Clases de flavonoides: núcleo básico y ejemplos²⁹.

Los tipos de flavonoides están relacionados por una vía biosintética común, la que incorpora precursores de las rutas del shikimato y la acetato-malonato. Posteriores modificaciones ocurren en varios estados, lo que resulta en la extensión de la hidroxilación, metilación, isoprenilación, dimerización y glicosilación, produciendo O y C-glicósidos^{30, 34}. De acuerdo a lo mencionado anteriormente la estructura básica de los flavonoides acepta una infinidad de patrones de sustitución y modificaciones en el anillo C y de acuerdo a las características de su estructura se pueden clasificar en³¹ (Figura 10):

1. Flavanos, tienen un grupo -OH en posición 3 del anillo C, ejemplo la catequina.
2. Flavonoles, poseen un grupo carbonilo en la ubicación 4 y un grupo -OH en la ubicación 3 del anillo C, como la quercetina.

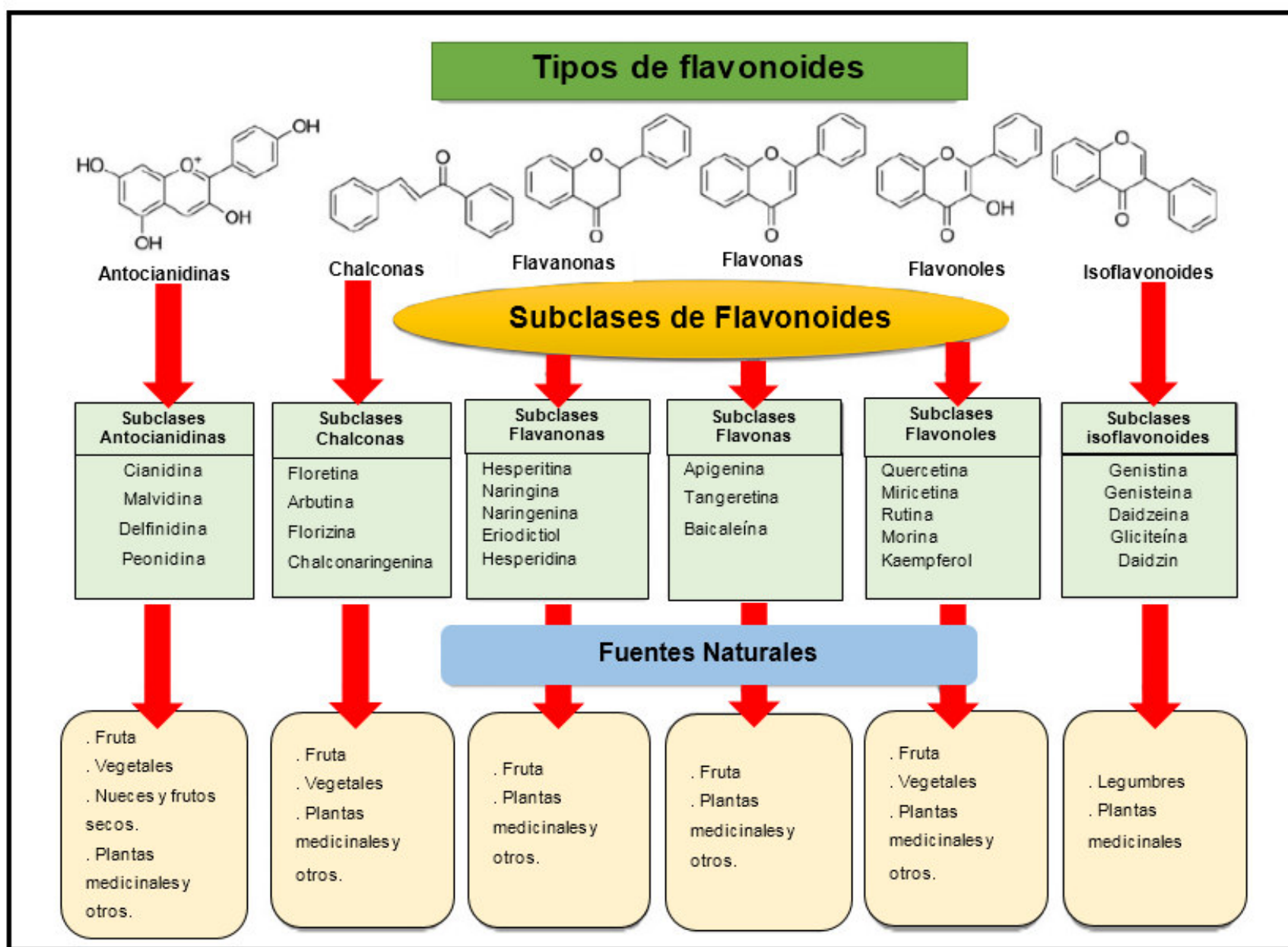


Figura 10. Tipos de flavonoides, subclases y fuentes naturales²⁹.

3. Flavonas, poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C₃, ejemplo la diosmetina.
4. Antocianidinas, presentan el grupo -OH en posición 3 y además tienen un doble enlace entre las posiciones 3 y 4 del anillo C.

- **Características físicas**

Los flavonoides son compuestos sólidos cristalizados de color blanco. Si se presentan en forma de heterósidos son insolubles en sustancias apolares mientras que son solubles en agua caliente, etanol y disolventes orgánicos polares. No obstante, cuando se encuentran en estado libre, son menos solubles en agua, pero se solubilizan en disolventes orgánicos más o menos oxigenados, de acuerdo a su polaridad. Por otro lado, son compuestos fácilmente oxidables y, por tanto, tienen efecto antioxidante, ya que se oxidan rápidamente en comparación con otras clases de sustancias³³.

- **Propiedades biológicas**

Los flavonoides poseen propiedades antialérgicas, antiasmáticas, antiinflamatorias, antimicrobianas, antioxidante, antitrombóticas, antitumorales e inhibidoras de enzimas (transcriptasa reversa, proteína quinasa C, tirosina quinasa C, entre otras). De las propiedades mencionadas la de mayor importancia: su efecto antioxidante que ha sido blanco de un sinnúmero de estudios entre los cuales destacan los de tipo clínico y nutricional³⁵.

- **Propiedad antioxidante**

El efecto antioxidante de los flavonoides proviene de la acción conjunta de sus características quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres (RL), también a la inhibición de oxidasas, como la lipoxigenasa (LO), la ciclooxigenasa (CO), la mieloperoxidasa (MPO), la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa (XO); de esta manera se evita la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) *in vivo*, al igual que de hidroperóxidos orgánicos. Además, se ha dado a conocer que también inhiben enzimas involucradas de forma indirecta en los procesos oxidativos como la

fosfolipasa A2 (FLA2), a la vez inducen a otras con conocidas propiedades antioxidantes, como catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD). De este modo los flavonoides se interponen en las reacciones de propagación de RL^{35, 36}. De acuerdo a su forma estructural, los flavonoides con sustituyentes dihidroxílicos en las ubicaciones 3' y 4' en el anillo B se presentan más activos como antioxidantes, este efecto se refuerza con la presencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, en la ubicación 3 un grupo OH libre y en la posición 4 un grupo carbonilo³⁶ (Figura 11). La configuración de hidroxilo en el anillo B es el determinante más importante de la eliminación de ERO y especies reactivas de nitrógeno (ERN) porque dona hidrógeno y un electrón a los radicales hidroxilos, peroxilo y peroxinitrito, estabilizando y dando lugar a un radical flavonoide relativamente estable³².

Los flavonoides pueden prevenir las lesiones causadas por los radicales libres por los siguientes mecanismos: captación directa de ERO, activación de enzimas antioxidantes, actividad quelante de metales, reducción de los radicales α -tocoferilo, inhibición de las oxidasas, mitigación del estrés oxidativo causado por el óxido nítrico, aumento de los niveles de ácido úrico, aumento de las propiedades antioxidantes de los antioxidantes de bajo peso molecular^{37, 38}.

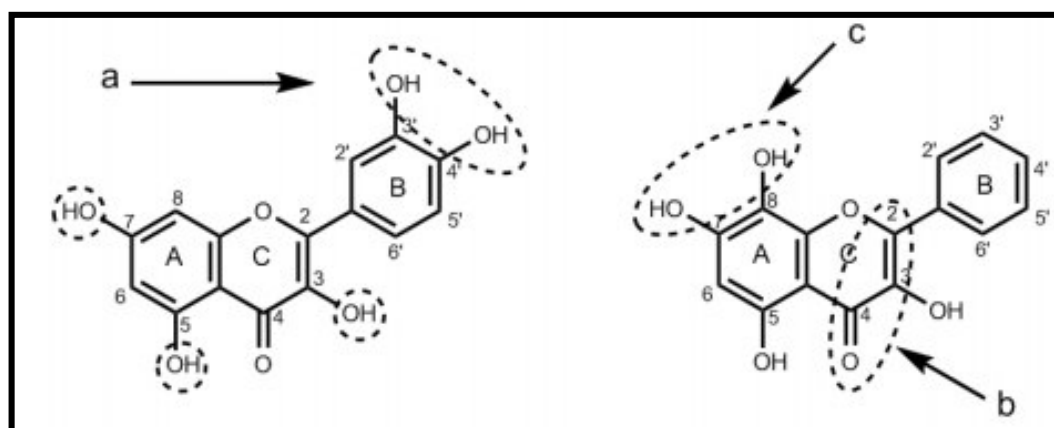


Figura 11. Resumen de las relaciones estructura-actividad antioxidante. Se han establecido estructuras químicas distintivas relacionadas con las actividades antioxidantes de los flavonoides, incluidos los grupos hidroxilo (c en la Figura 11), la disposición orto-dihidroxi en el anillo B (a en la Figura 11), el enlace insaturado C₂-C₃ combinado con el grupo carbonilo C₄ en el esqueleto C (b en la Figura 11), y O-metilación³⁷.

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, uno de los flavonoides que posee las características para ejercer una función antioxidante eficaz es la quercetina, pues ésta es cinco veces superior que la de las vitaminas C y E, asimismo posee una hidrosolubilidad similar a esta última³⁶. Las propiedades beneficiosas de la quercetina se relacionan estrechamente con su estructura química, que le confiere propiedades antioxidantes (Figura 12). Actúa como protector frente a las especies reactivas de oxígeno, mediante la neutralización de radicales libres como aniones superóxido, óxido nítrico y peroxinitritos entre otros. El efecto antioxidante también podría deberse a su capacidad para inhibir enzimas como la xantina oxidasa, lipooxigenasa y NADPH oxidasa, impidiendo la muerte celular. Además, puede incrementar la producción de antioxidantes endógenos³⁹.

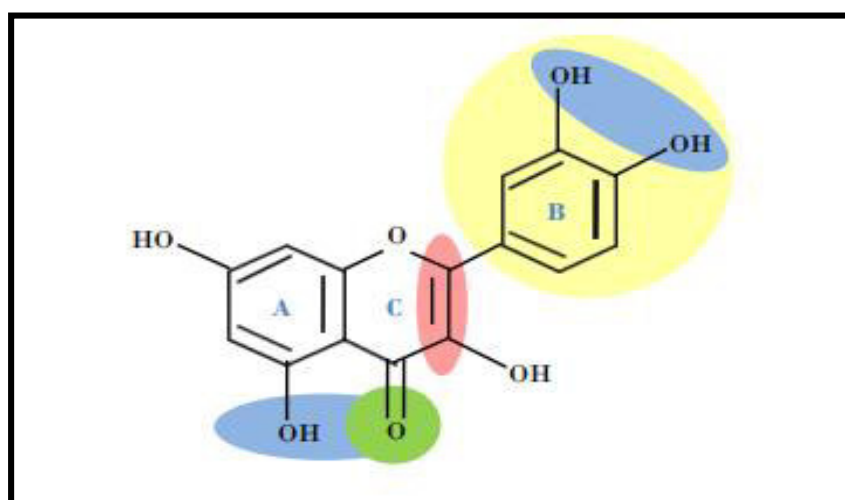


Figura 12. Estructura química de la quercetina mostrando los grupos funcionales que le confieren su actividad antioxidante. En amarillo, el grupo catecol del anillo B; en rojo, enlace insaturado del anillo C; en verde, función 4-oxo en el anillo C; en azul, puntos con capacidad de quelación de metales⁴⁰.

Este compuesto se caracteriza dentro de la familia de los flavonoides por presentar el potencial antioxidante mayor dentro de este grupo. El potencial antioxidante de la quercetina radica en la presencia de cinco grupos OH que pueden representar un sitio de ataque para el proceso de radicalización realizado por el radical peróxido lipídico. Este antioxidante se encuentra en plantas y alimentos de origen vegetal, presenta una coloración amarillo-verdoso y tiene una biodisponibilidad alta ⁴⁰.

2.1.5. Actividad antioxidante

2.1.5.1. Estrés oxidativo

El oxígeno es una molécula imprescindible para la vida que por su alta reactividad es un elemento tóxico que si se presenta una perturbación del equilibrio entre sustancias pro-oxidantes y antioxidantes a favor de las primeras, genera variadas reacciones con otros compuestos que se encuentran en el organismo, que pueden producir daño celular conocido como: estrés oxidativo^{41,42} (Figura 13). Del oxígeno se derivan moléculas inestables denominadas radicales libres que pueden causar daño a nivel celular, cuando se pierde el equilibrio entre las moléculas y el sistema de defensa antioxidante que poseen los seres vivos⁴³. De lo expuesto anteriormente, cuando las células usan oxígeno para generar energía, se crean radicales libres como consecuencia de la producción de ATP por parte de las mitocondrias, estos subproductos son generalmente los derivados de oxígeno (ERO), así como especies derivadas de nitrógeno (ERN) que resultan del proceso redox celular. Estas especies desempeñan un doble papel como compuestos tóxicos y beneficiosos. El delicado equilibrio entre sus dos efectos antagónicos es claramente un aspecto importante de la vida. En niveles bajos o moderados, ERO y ERN ejercen efectos beneficiosos sobre las respuestas celulares y la función inmunológica. En altas concentraciones, generan estrés oxidativo: proceso perjudicial que puede dañar todas las estructuras celulares⁴⁴.

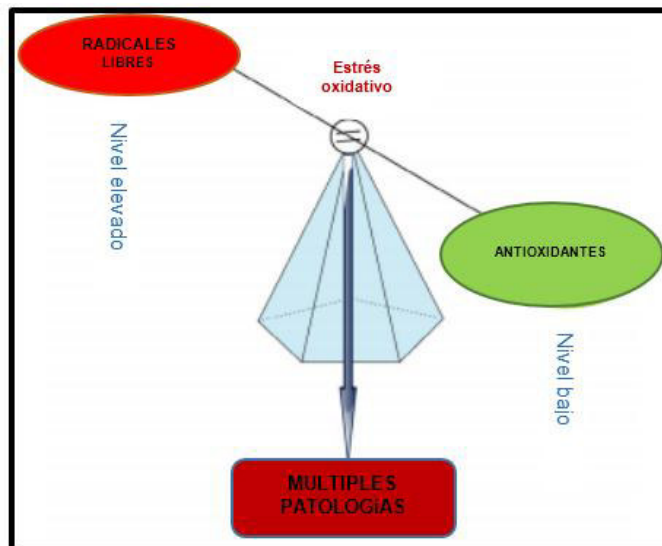


Figura 13. Estrés oxidativo: desequilibrio entre radicales libres y antioxidantes³⁷.

El estrés oxidativo juega un papel importante en el desarrollo de enfermedades crónicas y degenerativas: artritis, cáncer, envejecimiento, enfermedades cardiovasculares - neurodegenerativas y trastornos autoinmunes ⁴⁴ (Figura 14).

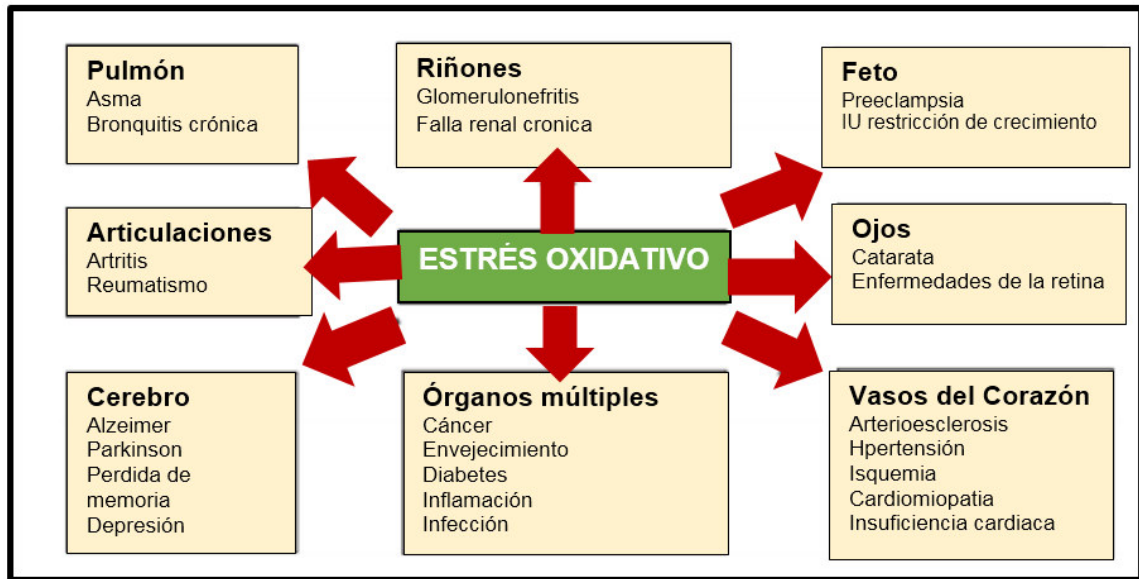


Figura 14. Enfermedades inducidas por estrés oxidativo en humanos⁴⁴.

2.1.5.2. Radicales libres

Los radicales libres son moléculas capaces de existir de forma independiente conteniendo en su última orbita uno o más electrones desapareados, que los torna muy inestables y altamente reactivos con capacidad para combinarse inespecíficamente, con las diferentes moléculas que integran la estructura celular y derivados de éstas, puede atacar cualquier tipo de biomolécula, ya que generalmente captan un electrón de otros átomos para así obtener su estabilidad electroquímica⁴⁵. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón (reducción) que necesita, la molécula estable que lo pierde (oxidación) se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una reacción en cadena. Las especies reactivas tienen capacidad de agresión indiscriminada sobre células y tejidos vivos, ya que no poseen receptores específicos. Los radicales libres se originan principalmente en la célula mediante transferencia de electrones, con o sin participación enzimática, mediada por iones metálicos de transición; existen tres mecanismos de formación de los RL⁴⁶:

- a) Por cesión de un electrón a una molécula llamado transferencia electrónica.
- b) Pérdida del protón de una molécula.
- c) Por separación de un enlace covalente de cualquier molécula, de modo que cada fragmento conserva uno de los electrones apareados del enlace.

Se generan distintas clases de RL como producto del metabolismo humano: especies reactivas de oxígeno (ERO: el anión superóxido, el anión peróxido) y especies reactivas de nitrógeno (ERN: óxido nítrico, radical peroxinitrito), entre otros, se originan en mitocondrias, lisosomas, peroxisomas y también en la membrana nuclear, citoplásmica y del retículo endoplásmico; una vez que el radical se genera tiene una vida media de microsegundos, corto lapso en el que interactúa con las biomoléculas cercanas^{44,47} (Figura 15). Los RL también se forman por factores externos como contaminación ambiental, exposición a radiaciones ionizantes, tabaco y medicamentos, entre otros⁴⁷.

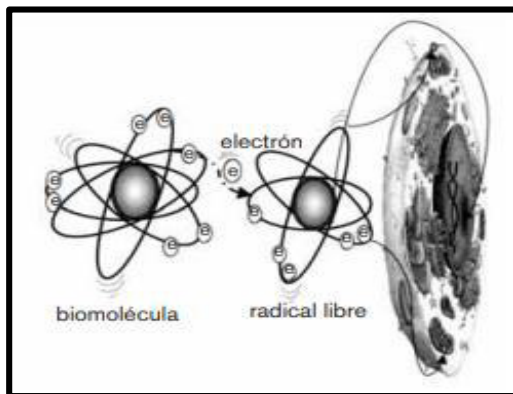


Figura 15. Interacción de los Radicales libres con biomoléculas⁴⁷.

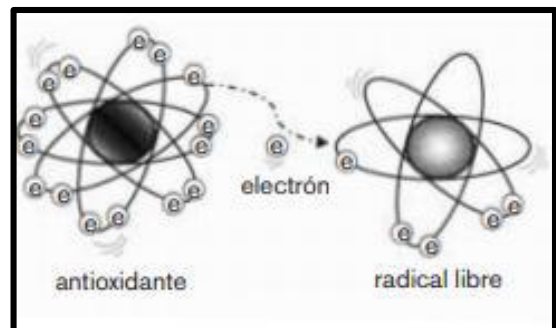


Figura 16. Interacción de los Radicales libres con antioxidantes⁴⁷.

2.1.5.3. Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias que retardan e inhiben la oxidación de sustratos susceptibles a los ataques de las ERO, entre otros. Todos los seres vivos que utilizan el oxígeno para obtener energía, liberan radicales libres que resulta incompatible con la vida a menos que existan mecanismos celulares de defensa que los neutralice⁴⁸. Las sustancias antioxidantes se clasifican en dos importantes sistemas, el sistema enzimático y el sistema no enzimático; también conocidos como endógeno y exógeno respectivamente; las cuales pueden actuar tanto en el espacio intracelular como en el extracelular⁴⁹ (Figura 16).

2.1.5.4. Sistemas antioxidantes enzimáticos

La superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX) son enzimas antioxidantes que desempeñan un papel fundamental e indispensable en la capacidad protectora antioxidante de los sistemas biológicos contra el ataque de los radicales libres. El radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) o el radical de oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) generado en los tejidos a través del metabolismo o reacciones en las células se convierten catalíticamente en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno molecular (O_2) mediante la SOD. El H_2O_2 cuando se acumula es tóxico para los tejidos corporales o células; además, en presencia de Fe^{2+} se convierten en radical hidroxilo (OH^{\cdot}) perjudicial a través de la reacción de Fenton. Para prevenir este fenómeno, la catalasa (otra enzima antioxidante), abundante en los peroxisomas, descompone el H_2O_2 en agua y oxígeno molecular, reduciendo así el daño inducido por radicales libres. Sin embargo, la CAT ausente en las mitocondrias, por lo que la reducción de H_2O_2 a agua y los peróxidos de lípidos a sus alcoholes correspondientes se lleva a cabo por la GPX. Este esfuerzo de protección colectiva se denomina defensa antioxidante de primera línea, y los antioxidantes involucrados se denominan antioxidantes de defensa de primera línea. El papel y la eficacia de los antioxidantes de defensa de primera línea, que incluyen básicamente SOD, CAT y GPX son importantes e indispensables en la estrategia de defensa de los antioxidantes, especialmente en referencia al radical superóxido aniónico que se genera perpetuamente en el metabolismo normal del cuerpo a través de varios procesos⁵⁰ (Figura 17).

De lo expuesto, podemos definir que la SOD cataliza la disminución del $\cdot\text{O}_2$ para formar H_2O_2 . Esta enzima está presente en el citosol (dependiente de Cu-Zn) y en la mitocondria (dependiente de Mn). La CAT es una hemoproteína tetramérica que presenta hierro en su núcleo, está localizada en los peroxisomas, con una doble actividad (catalasa y peroxidasa), la cual cataliza la reacción de reducción del peróxido de hidrógeno. Se encuentra en los peroxisomas celulares y en el citoplasma, principalmente en el hepatocito y los eritrocitos, aunque también está presente a bajas concentraciones en las células del cerebro, corazón y músculo esquelético. Cataliza la reacción de descomposición del H_2O_2 . La GPX se encarga de la reducción de hidroperóxidos intracelulares, peróxido de hidrógeno, grandes moléculas de peróxidos lipídicos procedentes del ataque de los radicales libres de oxígeno sobre los lípidos poliinsaturados de las membranas y sobre productos derivados de las reacciones catalizadas por la enzima lipooxigenasa⁵¹ (Tabla 3).

Tabla 3. Antioxidantes enzimáticos

Superoxido dismutasa	SOD	$\text{M}^{(n+1)+}\text{-SOD} + \text{O}_2^- \rightarrow \text{M}^{n+}\text{-SOD} + \text{O}_2$ $\text{M}^{n+}\text{-SOD} + \text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{M}^{(n+1)+}\text{-SOD} + \text{H}_2\text{O}_2$
Catalasa	CAT	$2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe(III)-E} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O} = \text{Fe(IV)-E(.,+)}$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O} = \text{Fe(IV)-E(.,+)} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{Fe(III)-E} + \text{O}_2$
Glutation peroxidasa	GPx	$2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$ $2\text{GSH} + \text{ROOH} \rightarrow \text{GSSG} + \text{ROH} + \text{H}_2\text{O}$
Tiorredoxina	TRX	Adenosina monofosfato + sulfato + Tiorredoxina Disulfuro = 5'- sulfato de adenilo + tiorredoxina Adenosina 3', 5' - bisfosfato + sulfito + disulfuro de Tiorredoxina = 3'- sulfato de fosfoadenililo + tiorredoxina
Peroxirredoxina	PRX	$2 \text{R}'\text{-SH} + \text{ROOH} = \text{R}'\text{-S-S-R}' + \text{H}_2\text{O} + \text{ROH}$
Glutation transferasa	GST	$\text{RX} + \text{GSH} = \text{HX} + \text{R-S-GSH}$

Fuente: Venereo J.⁴²

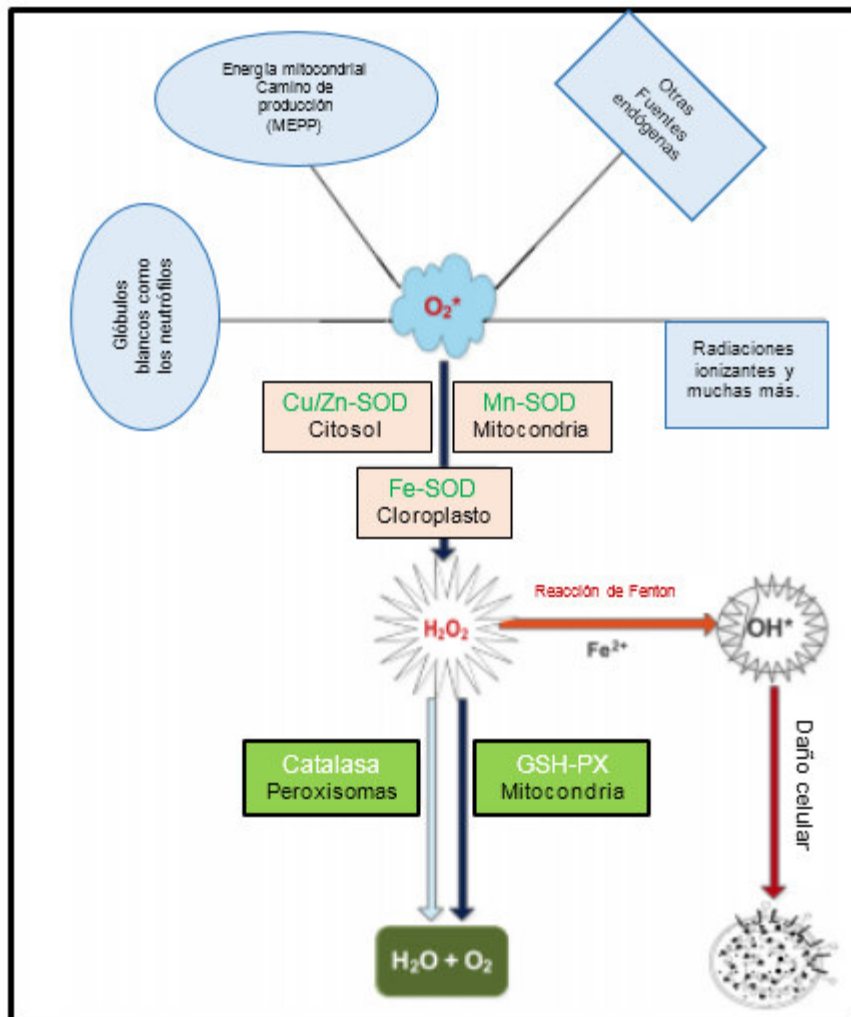


Figura 17. Defensa antioxidante de primera línea contra especies reactivas del oxígeno⁵⁰.

2.1.5.5. Sistemas antioxidantes no enzimáticos

El sistema de defensa antioxidante no enzimático incluye compuestos de bajo peso molecular, tales como vitaminas (vitaminas C y E), β -caroteno, ácido úrico, glutatión en su forma reducida (GSH), flavonoides, algunos minerales como selenio, zinc entre otros, que actúan como diversos secuestrantes para diferentes tipos de especies reactivas de oxígeno. Éstos son esenciales para la defensa contra el daño oxidante debido a que actúan como cofactores de las enzimas antioxidantes⁵².

La vitamina E soluble en lípidos se concentra en el sitio interior hidrófobo de la membrana celular y es la principal defensa contra la lesión de la membrana inducida

por el oxidante. La vitamina E dona electrones al radical peroxilo, que se produce durante la peroxidación lipídica. El α -tocoferol es la clase mas activa de vitamina E y el principal antioxidante en la célula unido a la membrana. La vitamina E desencadena la apoptosis de las células cancerosas e inhibe las formaciones de radicales libres⁵³. Representa la principal defensa contra el daño oxidativo de la membrana de los tejidos humanos y las principales funciones antioxidantes de la vitamina E son neutralizar el oxígeno singlete, capturar radicales hidroxilos libres, capturar O₂, neutralizar peróxido⁴⁸. La vitamina C es un antioxidante hidrosoluble con un alto poder reductor, proporciona una capacidad antioxidante de la fase acuosa intracelular y extracelular principalmente eliminando los radicales libres de oxígeno⁵². La vitamina C actua con la vitamina E regenerando la α -tocoferol desde el radical α -tocoferilo en membranas y lipoproteínas. La mayoría de plantas y animales sintetizan ácido ascórbico a partir de la glucosa; sin embargo, los humanos son incapaces de sintetizarlo y requieren obtenerlo de la dieta. Entre las principales funciones antioxidantes está neutralizar el oxígeno singlete, capturar radicales hidroxilos libres, capturar O₂, regenerar la forma oxidada de la vitamina E⁴⁸. Un hecho importante a destacar es el efecto sinérgico que puede existir entre los antioxidantes lipofílicos y los hidrofílicos. Se ha demostrado que la vitamina C mantiene los niveles de vitamina E y A en el medio, disminuyendo el estrés oxidativo al secuestrar radicales libres^{42, 54} (Tabla 4).

Tabla 4. Función de antioxidantes no enzimáticos

Antioxidantes no enzimático	Función Fisiológica
Vitamina E	Principal antioxidante presente en la membrana celular
Vitamina C	Efecto eliminador de radicales y recicla la vitamina E.
Ácido úrico	Su efecto es eliminar los radicales hidroxilo
Glutation	Tiene varios efectos en la defensa antioxidante celular.
Ácido lipoico	Antioxidante eficaz, y es un sustituto eficaz del glutathione.
Carotenoides	Antioxidante de lípidos
Bilirrubina	Producto del metabolismo del grupo hem de la hemoglobina y tiene un efecto antioxidante a nivel extracelular
Ubiquinonas	Derivado de quinonas lipídicas solubles, cuyas formas reducidas tienen efectos eficaces como antioxidantes

Fuente: Zamora J.⁴⁹

2.1.6. Actividad citotóxica

2.1.6.1. Citotoxicidad

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a que se produzca un daño que pueda ser detectado. A partir de aquí, diferentes autores han desarrollado baterías de pruebas *in vitro* para predecir los efectos tóxicos de las drogas y los compuestos químicos. Dentro de la batería de ensayos *in vitro* como métodos de toxicología alternativa útiles y necesarios para el registro o solicitud de ensayos clínicos de una sustancia dada se encuentran los llamados ensayos de citotoxicidad⁵⁵.

La definición de citotoxicidad generalmente depende de la clase del estudio, si las células tienen afectado su metabolismo o si mueren. Estos ensayos son empleados por ser baratos, también porque se pueden cuantificar y reproducir. Muchos experimentos *in vitro*, tienen la finalidad de determinar la potencial citotoxicidad de los compuestos estudiados ya que estos pueden ser usados como fármacos o cosméticos. Además, deben indicar que no son tóxicos para que puedan ser usados como anticancerígenos. La configuración de los modelos experimentales empleados *in vitro* para valorar la toxicidad de los compuestos químicos se fundamenta en dos pilares básicos, que son el sustrato biológico y los indicadores de toxicidad. El sustrato es el material generalmente orgánico sobre el que se aplica *in vitro* el Xenobiotico. Estas alteraciones se valoran mediante indicadores de toxicidad, que son los parámetros que se determinan para cuantificar las modificaciones producidas en la estructura o fisiología de los componentes del sustrato de ensayo⁵⁶.

2.1.6.2. *Artemia salina*

Artemia spp. es una especie de crustáceo minúsculo de cuerpo blando, color carmelita y transparente a la luz; pertenecen al Phylum Arthropoda, clase Crustaceae, subclase Branchiopoda. Se conocen comúnmente por el nombre de Artemia, también llamados “monos de mar” o “brine shrimp” en inglés. El género Artemia está compuesto por varias especies, de las cuales se han identificado al menos cinco especies bisexuales y varias poblaciones partenogenéticas, entre ellas *Artemia salina* Leach, *Artemia*

persimilis, *Artemia franciscana* Kellogg (bisexuales), *Artemia partenogenetica*. Estas especies se encuentran distribuidas en todo el mundo en aguas de elevada salinidad⁵⁷. La *Artemia salina* tiene una notable resistencia al cambio y puede vivir en una amplia variedad de salinidad del agua. *Artemia salina* adulta suele ser de unos 8-10 mm, pero puede alcanzar hasta 15 mm dependiendo de su entorno. Tiene un cuerpo alargado dividido en al menos 20 segmentos y unido a su tronco hay aproximadamente 10 conjuntos de apéndices planos, parecidos a hojas, llamados filopodios, que se baten a un ritmo regular⁵⁸ (Figura 18).

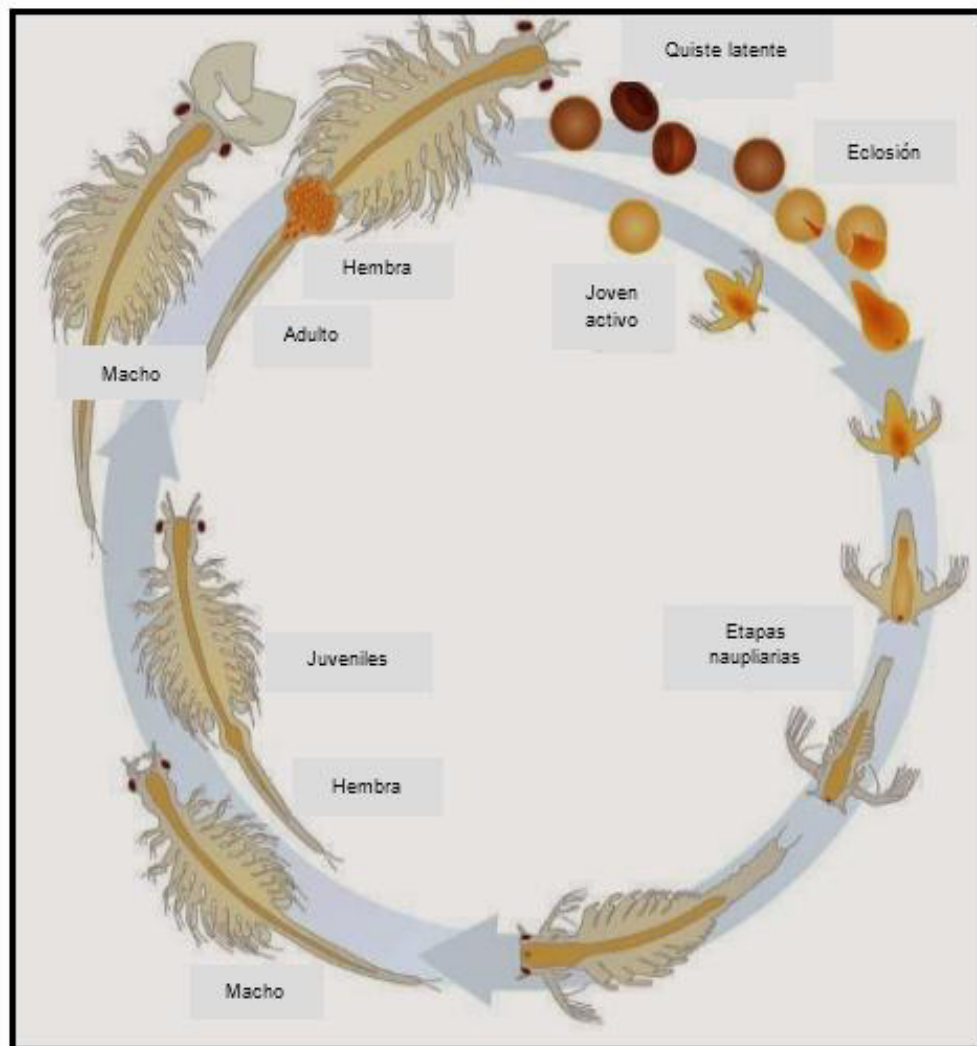


Figura 18. Ciclo de Vida de la *Artemia salina*⁵⁹.

En cuanto a su reproducción las hembras producen huevos que, en condiciones externas favorables, eclosionan produciendo larvas de un tamaño aproximado de 1 mm. Los huevos también pueden formar quistes y permanecer en esta forma por un año o más, estos quistes una vez puestos en agua de mar se hidratan tomando forma esférica y el embrión recobra su metabolismo reversible interrumpido. Tras unas 24 horas, la membrana externa de los quistes se rompe y aparece el embrión rodeado de la membrana de eclosión (Figura 19). Durante las horas siguientes, el embrión abandona completamente la cáscara vacía a la cual permanece todavía unido. Dentro de la membrana de eclosión se completa el desarrollo del nauplio, sus apéndices comienzan a moverse y en un breve periodo de tiempo la membrana de eclosión se rasga emergiendo el nauplio que nada libremente⁵⁹.

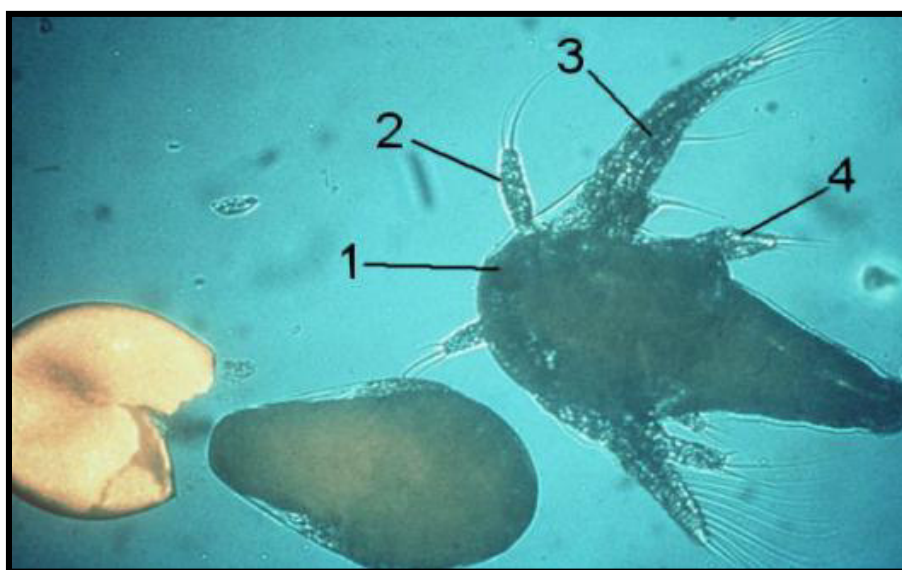


Figura 19. Eclosión del quiste y nauplio de *Artemia salina*. 1. Ojo naupliar, 2. Anténula, 3. Antena, 4. Mandíbula ⁶⁰.

2.1.6.3. Concentración letal media (CL₅₀)

La concentración letal media se calcula por estadística de una sustancia de la cual se espera produzca la muerte del 50% de los organismos de una población expuestos a dicha sustancia durante un periodo determinado. La medición CL₅₀ se hace en microgramos o miligramos de material por litro o partes por millón (ppm). Cuanto menor sea la concentración, más tóxica es la sustancia⁶¹.

2.1.6.4. Bioensayo de letalidad en *Artemia salina*

Uno de los biomodelos más utilizados en las etapas preliminares de la investigación fitoquímica, es el bioensayo de letalidad en *Artemia Salina*, desarrollada en 1982 por Meyer et al⁶². Para la evaluación inicial de extractos vegetales se acostumbra utilizar organismos vivos de fácil manejo y respuesta rápida; de estos la *Artemia salina* es uno de los más utilizados por ofrecer las ventajas de ser un bioensayo rápido, barato y de fácil manipulación que pueden realizarse dónde y cuando sea necesario⁵⁷.

El ensayo de letalidad con *Artemia salina* se basa en la posibilidad de causar la muerte de larvas (nauplios o nauplii) de este crustáceo cultivado en el laboratorio. Este método, en el cual se determina el valor de la CL₅₀ de compuestos y extractos en medio salino, ha sido utilizado para la detección de toxinas de hongos y cianobacterias, toxicidad de extractos de plantas, residuos de pesticidas, corrientes contaminadas, anestésicos, compuestos similares a morfina, metales pesados y para predecir citotoxicidad de compuestos puros^{62,63,64}.

III. METODOLOGÍA

3.1. Tipo de investigación

El diseño de la investigación fue de tipo cuasi-experimental ya que existió una ‘exposición’, una ‘respuesta’ y una hipótesis para contrastar, pero no hay aleatorización, es decir es un diseño que esta dirigido y orientado con equipos ya estandarizados; comparativo ya que se va a contrastar las capacidades antioxidante y citotóxica de hojas, tallo y raíz de la planta; y prospectivo ya que los datos de los resultados se recogieron a medida que se van sucediendo⁶⁵.

3.2. Diseño de la investigación

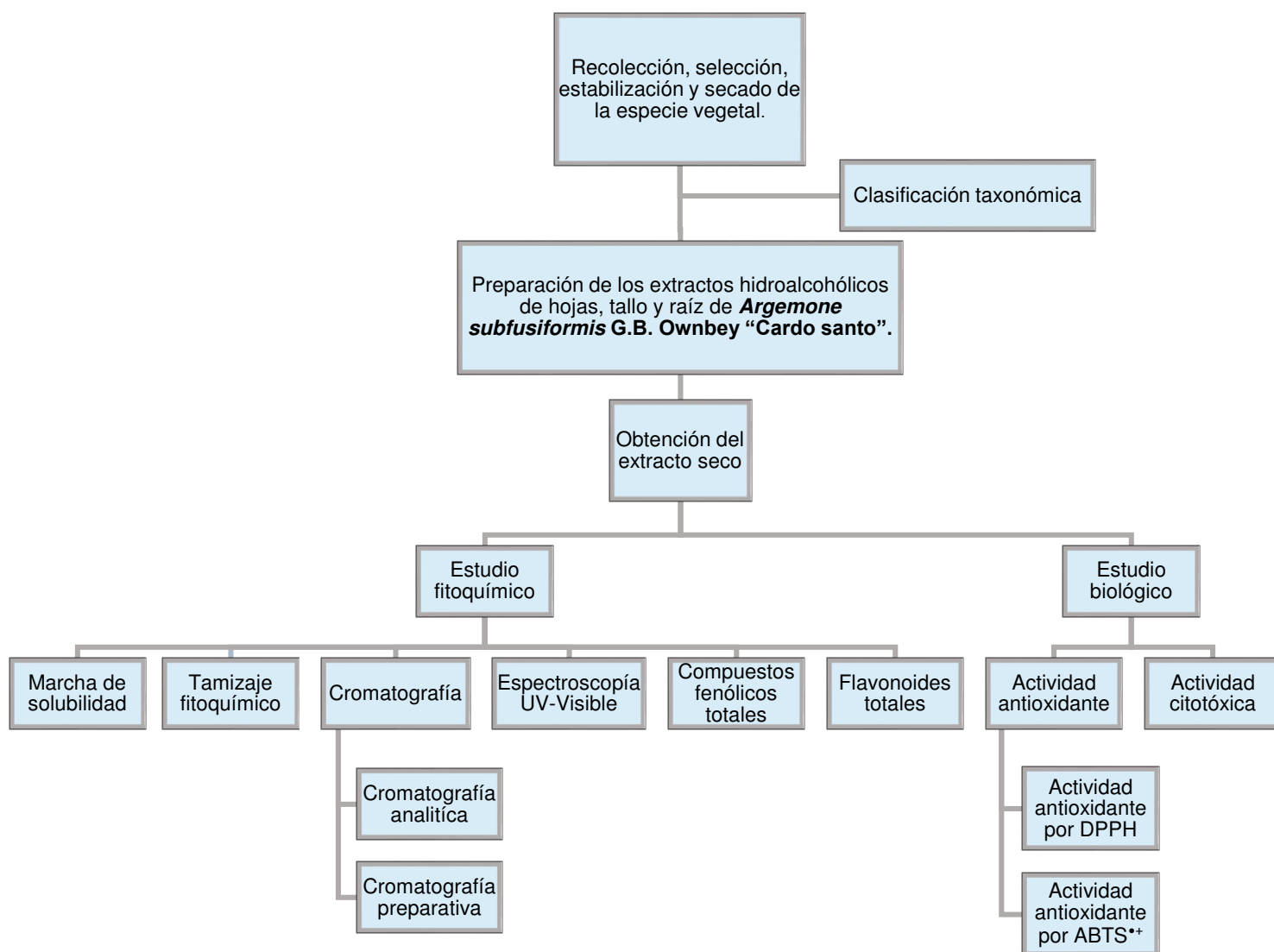


Figura 20. Esquema de la metodología empleado en los procedimientos experimentales.

3.3. Materiales

3.3.1. Materiales, equipos y reactivos

a) Materiales de laboratorio

Los materiales de laboratorio incluyeron: Frascos ámbar, mortero y pilón, beaker de 100 mL, 250 mL y 500 mL, soporte universal, pinzas, bombilla, aros, embudo de vidrio, gradilla, tubos de ensayo, baguetas, probetas, pipetas Pasteur de plástico y vidrio, pipetas graduadas de 1mL, 5mL y 10mL, placas de vidrio para cromatografía en capa fina 5 x 20 cm, cubas de saturación para cromatografía en capa fina de 5 x 10 cm y 10 x 30 cm, capilares, micropipetas de 5-50 μ L, 10-100 μ L, 50-200 μ L, 100-1000 μ L y 500-50000 μ L, tubo cónico graduado, punteras y tips, placas Petri, parafilm, papel filtro whatman N° 40, papel aluminio, viales, lámpara doméstica y lupa.

b) Equipos e instrumentos

Los equipos empleados incluyeron: Molino (Wiley Mill), estufa (Memmert), balanza digital (Laboratorio Precisión ES-2100A 2100gr x 0,1g), lámpara de luz UV (Chromato-Vue®, C-70G, UV Viewing System), espectrofotómetro (GENESYS 10S UV-Visible-Thermo Scientific), agitador (Super-Mixer), cubeta de cuarzo, incubadora, equipo de burbujeo para pecera, termohigrometro (Clock & Hygro-Thermoneter) y equipo de laboratorio HACH.

c) Reactivos

Los reactivos empleados en las reacciones químicas fueron: Reactivos de Molish, FeCl₃, Shinoda, Mayer, Liebermann Burchard, Dragendorff, Bertrand, Sonnenschein, Duhcard, Ninhidrina 1 %, Borntranger, 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil, ácido 2,2'-azino-bis-(3 ethilbenzotiazolin)-6-sulfónico), reactivo de Folin-Ciocalteu, persulfato de potasio, ácido gálico, tricloruro de aluminio (AlCl₃), carbonato de sodio (Na₂CO₃), estándares de Trolox y quercetina. También se emplearon los siguientes solventes: Cloroformo, metanol, etanol 96°, n-butanol, hidróxido de amonio, acetato de etilo, DMSO, etanol absoluto, agua destilada y agua bidestilada.

3.3.2. Materiales biológicos

a) Material vegetal

La materia prima estuvo formada por hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey “Cardo santo”.

b) Material animal

Se encuentra conformado por los quistes de *Artemia salina*.

3.4. Ambiente de trabajo

Los análisis correspondientes a la marcha de solubilidad, tamizaje fitoquímico, cromatografías y espectroscopía UV-Visible fueron realizados en el laboratorio del Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica; las cuantificaciones correspondientes a compuestos fenólicos totales, flavonoides totales y actividad antioxidante fueron realizadas en el laboratorio del Instituto de Investigación de Bioquímica y Nutrición “Alberto Guzmán Barrón” de la Facultad de Medicina; mientras que la determinación de la actividad citotóxica fue realizada en el laboratorio de Farmacognosia y Medicina Tradicional “Bertha Jurado” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica. Los centros de estudio mencionados pertenecen a la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.5. Recolección y clasificación taxonómica

La recolección de la planta se realizó en el distrito de Moro, ubicado en el departamento de Áncash. La clasificación taxonómica y certificación de la especie vegetal fue realizada por la Mg. María I. La Torre en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, siendo identificada como *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey “Cardo santo” (Anexo N°1).

3.6. Estabilización, selección y secado

El material recolectado fue acondicionado y estabilizado en el laboratorio del Instituto de Investigación de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos a temperatura ambiente y en sombra. Se realizó la selección de las hojas, tallos y raíces en buen estado; las mismas que fueron llevadas a secar en una

estufa a 40° C. Una vez secada cada una de las muestras se sometieron a un proceso de reducción de tamaño de partículas con la ayuda de un mortero y un molino de cuchillas (Anexo N°2).

3.7. Preparación de los extractos hidroalcohólicos

Para la obtención de los extractos se empleó el método de maceración donde unas cantidades de materia prima vegetal y de solvente fueron colocados en frascos de vidrio de boca ancha y color ámbar para mezclar el extracto mediante agitación constante durante siete días, la solución obtenida se filtró y se concentró en estufa de aire circulante a 40°C hasta sequedad (Tabla 5, Anexo N°2).

Tabla 5. Cantidades de materia prima vegetal y solvente (etanol 96°) empleados en el proceso de extracción por el método de maceración

	Material vegetal (g)	Etanol 96° (L)
Hojas	275	2
Tallo	235	1.25
Raíz	119	0.75

3.8. Estudio fitoquímico

3.8.1. Marcha de solubilidad

La marcha de solubilidad se realizó ordenando una batería de tubos en una gradilla, donde se colocó pequeñas porciones de cada extracto hidroalcohólico desecado y adicionándole a cada tubo un 1 mL de cada solvente de acuerdo a su polaridad creciente⁶⁶.

3.8.2. Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico o screening fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales metabolitos secundarios presentes en la especie vegetal de interés. Los metabolitos secundarios fueron determinados mediante las técnicas de Olga Lock de Ugaz, en las cuales se da reacciones químicas que se manifestaron mediante cambios de color o formación de precipitados⁶⁶ (Anexo N°3-5).

3.8.3. Cromatografía

La cromatografía en capa fina analítica se realizó utilizando los sistemas de solvente cloroformo: metanol (3:1), n-butanol: agua: hidróxido de amonio (8:1:1), acetato de etilo: etanol (30:10); las placas con este último sistema de solventes después de haber cumplido su recorrido fueron revelados con los reactivos de tricloruro de hierro (FeCl_3) y Dragendorff. La cromatografía en capa fina preparativa se realizó empleando el sistema cloroformo: metanol (30:10). Todas las cromatoplasacas fueron reveladas con lámpara de luz UV-Visible a 254 nm y 365 nm (Anexo N°6).

3.8.4. Espectroscopía UV-Visible

El método más usual para el análisis de estructura de un flavonoide es la espectroscopía UV-Visible⁶⁶, por ello con las cromatoplasacas obtenidas de la cromatografía en capa fina preparativa se procedió a realizar raspados en las placas teniendo en cuenta el número de manchas o fracciones obtenidas de cada extracto, posteriormente cada raspado es diluido en etanol para ser leído en el espectrofotómetro UV-Visible a una longitud de onda entre 200 nm y 400 nm donde los flavonoides poseen espectros con intensas absorciones que nos permitieron proponer algunas estructuras químicas de los flavonoides de acuerdo a lo publicado por Mabry et al⁶⁷.

3.8.5. Cuantificación de compuestos fenólicos totales

a) Fundamento

Los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, el que está formado por una mezcla de ácido fosfotúngstico ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) y ácido fosfomolibdico ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$), la cual, a través de la oxidación de los fenoles, es reducida en medio básico a óxidos azules de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), respectivamente y susceptible a ser cuantificado espectrofotométrica a 765 nm⁶⁸ (Figura 21).

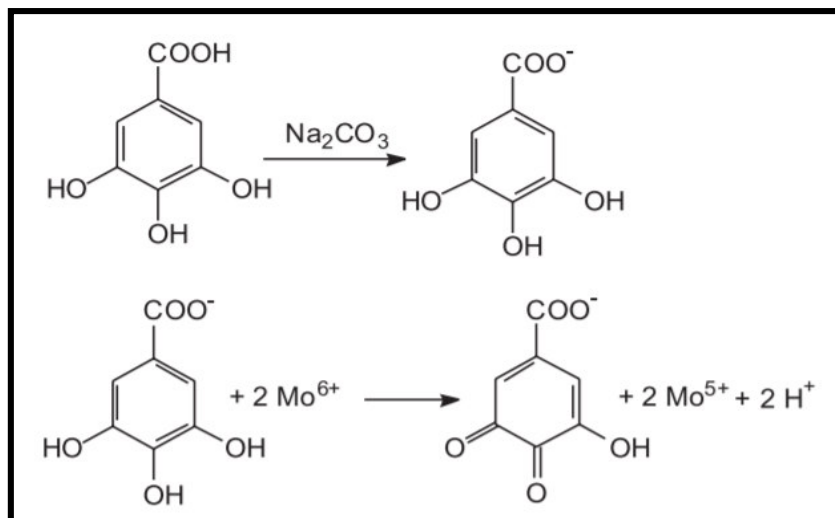


Figura 21. Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu⁶⁹.

b) Procedimiento

Para la cuantificación de compuestos fenólicos se elaboró una curva de calibración de ácido gálico cuyo rango de concentración comprendió entre 10 y 60 $\mu\text{g/mL}$. Los extractos hidroalcohólicos de la planta (hojas, tallo y raíz) fueron evaluados a una concentración de 100 mg/mL , a partir de la cual se prepararon diluciones, a cada 100 μL de disolución se le añadió 500 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 400 μL de Na_2CO_3 7,5 %; se agitó y se le llevó a reposo por 30 minutos a temperatura ambiente. Dicha determinación también incluyó una solución de ácido gálico a una concentración de 30 $\mu\text{g/mL}$ (a cada 100 μL de ácido gálico se le adicionó 500 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu y 400 μL de Na_2CO_3 7,5 %) y un blanco (a cada 100 μL de agua se le adicionó 500 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu y 400 μL de Na_2CO_3 7,5 %) con el cual se calibró el espectrofotómetro. Transcurrido el tiempo las muestras respectivas fueron leídas a una longitud de onda de 765 nm.

Todas las muestras, así como la solución estándar de ácido gálico fueron leídas por triplicado.

c) Análisis de datos:

Los resultados fueron expresados como el promedio de tres repeticiones \pm la desviación estándar (DE) y como unidades de ácido gálico equivalentes por gramo de extracto seco y concentración de ácido gálico por gramo de extracto seco.

3.8.6. Cuantificación de flavonoides totales

a) Fundamento

Estos compuestos suelen presentar en su estructura hidroxilos fenólicos, condición que facilita su clasificación y reactividad frente al tricloruro de aluminio, por ello este método se basa en la reacción de formación de un complejo coloreado de color amarillo que se forma al reaccionar el flavonoide con el tricloruro de aluminio, mismo que actúa como excelente catalizador para la reacción de coloración⁷⁰ (Figura 22).

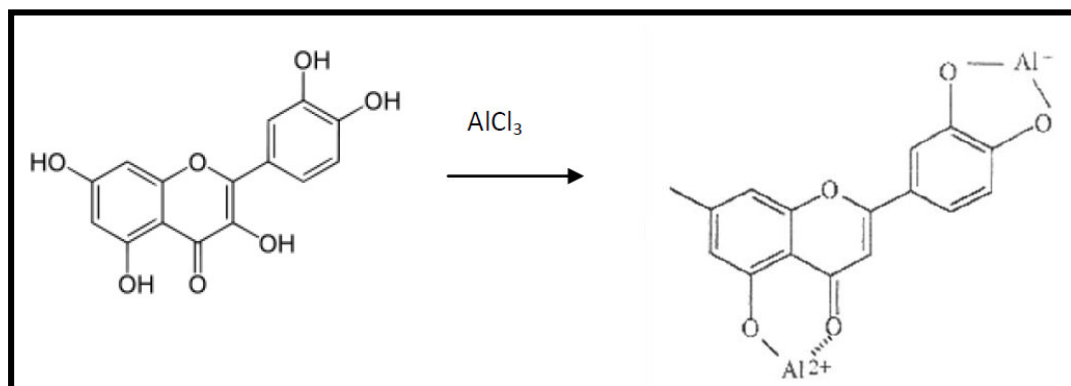


Figura 22. Complejo Flavonoide-Aluminio⁷¹.

b) Procedimiento

La determinación del contenido de flavonoides totales se efectuó con el método de tricloruro de aluminio (AlCl_3), utilizando como estándar a la quercetina dihidratada a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$. Los extractos hidroalcohólicos de la planta (hojas, tallo y raíz) fueron evaluados a una concentración de 100 mg/mL , a partir de la cual se prepararon diluciones, a cada 100 μL de cada disolución, se adicionó 100 μL tricloruro de aluminio al 2.5 % y 800 μL de agua, se agitó y se mantuvieron en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Dicha determinación

también incluyo una solución de quercetina (a cada 100 μL de quercetina se le agregó 100 μL de AlCl_3 y 800 μL de agua) y un blanco (a cada 100 μL de AlCl_3 se le adicionó 900 μL de agua) con el cual se calibro el espectrofotómetro. Transcurrido el tiempo las muestras respectivas fueron leídas a una longitud de onda de 432 nm. Todas las muestras, así como la solución estándar de quercetina fueron leídas por triplicado.

c) Análisis de datos:

Los resultados fueron expresados como el promedio de tres repeticiones \pm DE y como unidades de quercetina equivalentes por gramo de extracto seco y concentración de quercetina por gramo de extracto seco.

3.9. Estudio biológico

3.9.1. Determinación de la actividad antioxidante

3.9.1.1. Método: Captación del radical 2,2-difenil-1- picrilhidrazil (DPPH)

a) Fundamento

La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH \cdot) es un radical que tiene un electron desapareado que se manifiesta con un color violeta intenso que se desvanece cuando reacciona con una solución antioxidante, dicho cambio es monitoreado y cuantificado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 517 nm⁷² (Figura 23).

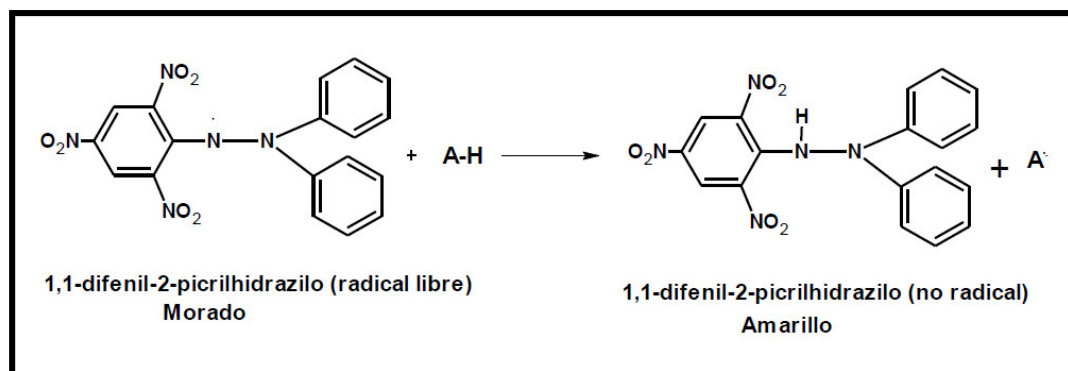


Figura 23. Reacción química entre el radical DPPH y la especie antioxidante⁷².

b) Procedimiento.

Para preparar el radical DPPH• se preparó una solución de 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil 1 mM (DPPH) a una concentración 20mg/100 mL en etanol absoluto hasta obtener una solución homogénea de color morado. Una vez formado el radical DPPH• se diluye con etanol hasta obtener una absorbancia comprendida entre 0.9 ± 0.02 a longitud máxima de absorción de 517 nm. Para evitar la degradación de la solución preparada, esta se almacenó en un frasco de color ámbar y a condiciones de temperatura de 4°C.

Luego se prepara una batería de tubos de cada muestra (hojas, tallo y raíz) a diferentes concentraciones dando concentraciones finales de 0, 120, 240, 360, 480 y 600 µg/mL para las hojas; 0, 100, 200, 300 y 400 µg/mL para el tallo; 0, 300, 600, 900 y 1200 µg/mL para la raíz. Seguidamente se mezcló 400 µL de cada concentración ya mencionada con 800 µL de la solución de trabajo de DPPH• y luego se procedió a agitar para homogenizar. La reacción se desarrolló en oscuridad durante 30 minutos para leerse a una longitud de onda de 517 nm. Para la preparación de la curva de calibración del estándar Trolox se aplicó el mismo procedimiento que a las muestras de la planta obteniendo concentraciones finales de 0, 1, 2, 3, 4 y 5 µg/mL.

Todos los extractos, así como la solución del estándar Trolox fueron leídos por triplicado y cada lectura fue por duplicado. En cuanto al espectrofotómetro este se calibró con un blanco que contenía 400 µL de agua y 800 µL de etanol.

La actividad antioxidante se determinó con las absorbancias obtenidas que se expresó como porcentaje de inhibición, lo cual corresponde a la cantidad de radical DPPH• neutralizado por el extracto a una determinada concentración, de acuerdo a la siguiente expresión⁷³:

$$\% \text{ Inhibicion} = \frac{(Abs. DPPH - Abs. muestra)}{Abs. DPPH} \times 100$$

Donde:

Abs. DPPH = Absorbancia de DPPH

Abs. Muestra = Absorbancia de muestra

c) Análisis de datos:

Los resultados fueron registrados como el promedio de tres repeticiones \pm DE. Los resultados fueron convertidos a porcentaje de inhibición, concentración inhibitoria media (**IC₅₀**) y expresada como valores de capacidad antioxidante equivalente a Trolox (**TEAC**) o unidades de Trolox equivalentes por gramo de extracto seco.

3.9.1.2. Método: Captación del radical ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín)-6 Sulfónico (ABTS^{•+})

a) Fundamento

El radical ABTS^{•+} es generado por una reacción de oxidación del ABTS (2,2'-azino-bis- (3-etil benzotiazolín-6-sulfonato de amonio) con persulfato de potasio. Este cromóforo es de color verde azulado que se desvanece cuando reacciona con una solución antioxidante, dicho cambio es monitoreado y cuantificado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 734 nm⁷² (Figura 24).

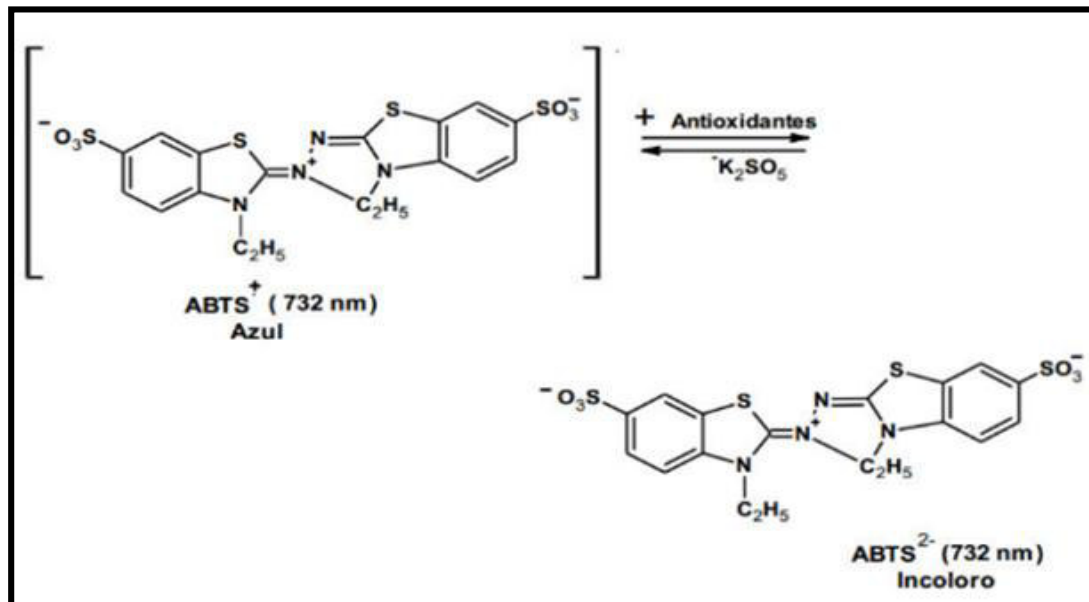


Figura 24. Reacción química entre el radical ABTS^{•+} y la especie antioxidante⁷².

b) Procedimiento

Para preparar el radical ABTS^{•+} se mezcló ABTS (7mM) con persulfato potásico (2.45 mM) incubados en oscuridad a temperatura ambiente (25°C) durante 16 horas. Formado el radical ABTS^{•+} se diluye con agua bidestilada hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0.7 ± 0.02 a longitud máxima de absorción de 734 nm.

Luego se prepara una batería de tubos de cada muestra (hojas, tallo y raíz) a diferentes concentraciones dando concentraciones finales de 0, 40, 80, 120, 160, 200 y 240 µg/mL para las hojas; 0, 30, 60, 90, 120 y 150 µg/mL para el tallo; 0, 100, 200, 300, 400 y 500 µg/mL para la raíz. A continuación, se mezcló 20 µL de cada concentración ya mencionada con 980 µL de la solución de trabajo de ABTS^{•+} y luego se procedió a agitar para homogenizar. La reacción se desarrolló en oscuridad durante 7 minutos para leerse a una longitud de onda de 734 nm.

Para la preparación de la curva de calibración del estándar Trolox se aplicó el mismo procedimiento que a las muestras de la planta obteniendo concentraciones finales de 0, 1, 2, 3, 4 y 5 µg/mL.

Todos los extractos, así como la solución estándar Trolox fueron leídos por triplicado y cada lectura fue por duplicado. En cuanto al espectrofotómetro este se calibró con un blanco que contenía agua bidestilada.

La actividad antioxidante se determinó con las absorbancias obtenidas que se expresó como porcentaje de inhibición lo cual corresponde a la cantidad de radical ABTS^{•+} neutralizado por el extracto a una determinada concentración, de acuerdo a la siguiente expresión⁷³:

$$\% \text{ Inhibicion} = \frac{(Abs. ABTS - Abs. muestra)}{Abs. ABTS} \times 100$$

Donde:

Abs. ABTS = Absorbancia de ABTS

Abs. Muestra = Absorbancia de muestra

c) Análisis de datos:

Los resultados fueron registrados como el promedio de tres repeticiones \pm DE. Los resultados fueron convertidos a porcentaje de inhibición, **IC₅₀** y expresada como valores de **TEAC** o unidades de Trolox equivalentes por gramo de extracto seco.

El **IC₅₀** se determinó a partir de la gráfica absorbancia versus concentraciones de cada extracto; y corresponde a la concentración a la que se neutraliza o se produce una inhibición del 50% de los radicales libres de DPPH/ ABTS^{•+}. Para la clasificación se tomó como referencia las recomendaciones de la Tabla 6⁷².

Tabla 6. Clasificación de la actividad antioxidante según los valores de IC₅₀

Alto potencial antioxidante	< 30	µg/mL
Moderado potencial antioxidante	30 entre 100	µg/mL
Bajo potencial antioxidante	>100	µg/mL

El **TEAC** representa la concentración de la solución Trolox que tiene la misma capacidad captadora de radicales libres que el extracto y se estableció usando la siguiente expresión **TEAC** = **IC₅₀Trolox/IC₅₀ Extracto**⁷⁴.

3.9.2. Determinación de la actividad citotóxica

a) Fundamento

El bioensayo de toxicidad se basa en la determinación de la concentración que causa la muerte del 50% de las larvas de *Artemia salina* en 24 horas bajo las condiciones descritas por este procedimiento. Esta concentración es conocida como concentración letal media CL₅₀^{57, 75}.

b) Procedimiento

El comportamiento citotóxico de cada extracto hidroalcohólico frente a los nauplios de *Artemia salina* fueron evaluados de acuerdo al Manual de Técnicas

de Investigación del CYTED (Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo)⁷⁶.

- **Eclosión:**

Para el cultivo de la *Artemia salina* se preparó agua de mar artificial disolviendo 38 gramos de sal en 1000 mL de agua (se usó para este ensayo agua tipo 2), la misma que fue filtrada. Una vez preparado el medio artificial se verificó que la medida del pH (9.17), conductividad (57.4 mS/cm) y salinidad (40.3 %) sean los adecuados para la eclosión de los quistes (Anexo N°9). Seguidamente se adecuó un recipiente que contenga el agua de mar artificial que hiciera las veces de cámara de incubación, la misma que constó de dos compartimentos (uno oscura y otro iluminado por una lámpara), durante el tiempo de incubación se mantuvo un flujo constante de aire para garantizar la eclosión. Para la prueba se coloca 50 mg de quistes de *Artemia salina* en 350 mL de agua de mar artificial y todo se coloca en la cámara de incubación. A las 48 horas se observó la eclosión de los nauplios (Anexo N°10-11).

- **Bioensayo:**

Para el ensayo se utilizaron 10 larvas o nauplios que se sometieron a las concentraciones de 500, 550, 600, 650, 700 y 750 µg/mL de los extractos hidroalcohólicos (hojas, tallo y raíz) utilizados. Además, se incluyó un grupo control con todos los elementos del ensayo, excepto la muestra a ensayar, se realizó tres réplicas para cada grupo (Anexo N°11).

- **Conteo de nauplios:**

Durante el bioensayo se registra el número de nauplios puestos inicialmente en cada vial, al cabo de 24 horas de contacto con los extractos ensayados se realizó el conteo del número de nauplios muertos y sobrevivientes para determinar la concentración letal media CL₅₀. La larva es considerada muerta si no se observa movimiento de los apéndices durante 10 segundos (Anexo N°11).

c) Análisis de datos:

Se calculó CL₅₀ con la ayuda del análisis de regresión logarítmico PROBIT a través del programa estadístico SPSS 24. Para la clasificación se tomó como referencia las recomendaciones del CYTED como indica en la Tabla 7⁷⁶.

Tabla 7. Clasificación de toxicidad según CYTED⁷⁶

I	Extremadamente tóxico	0-10	µg/mL
II	Altamente tóxico	10-100	µg/mL
III	Moderadamente tóxico	100-500	µg/mL
IV	Ligeramente tóxico	500-1000	µg/mL
V	Prácticamente no tóxico	1000-1500	µg/mL
VI	Relativamente inocuo	<1500	µg/mL

4.0. Métodos estadísticos para el análisis de resultados

Para la actividad antioxidante los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) y a la prueba de Tukey a través del programa estadístico STATISTICA 10. Para la actividad citotóxica la CL₅₀ se determinó con la ayuda del análisis de regresión logarítmico PROBIT a través del programa estadístico SPSS 24.

IV. RESULTADOS

4.1. Análisis preliminar de los extractos hidroalcohólicos

En la Tabla 8 se muestra la caracterización organoléptica considerando aspecto, color, olor y sabor; gramos de extracto seco y rendimiento obtenido de los extractos hidroalcohólicos desecados de hojas, tallo y raíz.

Tabla 8. Propiedades físicas, gramos del extracto seco y rendimiento de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey

<i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey “Cardo santo”			
	Hojas	Tallo	Raíz
Aspecto	Masa amorfa	Masa menos homogénea	Masa homogénea
Color	Verde oscuro	Marrón oscuro	Marrón claro
Olor	Sui generis	Sui generis	Sui generis
Sabor	Amargo, astringente	Amargo, astringente	Amargo, astringente
Extracto seco (g)	39.4	31.9	8.4
Rendimiento %	14.32 %	13.57 %	7.05 %

4.2. Marcha de solubilidad de los extractos hidroalcohólicos

Los resultados de la marcha de solubilidad muestran que los extractos hidroalcohólicos secos son solubles en compuestos polares y de mediana polaridad (Tabla 9).

Tabla 9. Marcha de solubilidad de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey

SOLVENTES	RESULTADOS		
	Hojas	Tallo	Raíz
Cloroformo	(+)	(-)	(-)
Acetato de etilo	(-)	(-)	(-)
Acetona	(-)	(-)	(-)
Metanol	(+++)	(+++)	(+++)
Etanol	(++)	(++)	(++)
DMSO	(+++)	(+++)	(++)
Agua	(+++)	(+++)	(++)

Leyenda: (+++) Muy Soluble; (++) Soluble; (+) Poco Soluble; (-) Insoluble

4.3. Tamizaje fitoquímico de los extractos hidroalcohólicos

De manera cualitativa, se logró identificar que las hojas, tallo y raíz presentan abundante presencia de alcaloides, poca cantidad de compuestos fenólicos y azúcares; las hojas y tallo presentan bastante cantidad de flavonoides en comparación con la raíz que presenta poca cantidad; en cuanto a la presencia de taninos las hojas y raíz presentan abundante cantidad a comparación del tallo; no se encontraron presencia de saponinas; tal como se puede apreciar en la Tabla 10 (Anexo N°3-5).

Tabla 10. Tamizaje fitoquímico de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey

REACTIVO	METABOLITO SECUNDARIO	RESULTADOS		
		Hojas	Tallo	Raíz
Molisch	Carbohidratos (azúcares)	(+)	(+)	(+)
Cloruro de Hierro	Compuestos fenólicos	(+)	(+)	(+)
Shinoda	Flavonoides	(++)	(++)	(+)
Dragendorff	Alcaloides	(+++)	(+++)	(+++)
Mayer	Alcaloides	(++)	(+++)	(+++)
Bertrand	Alcaloides	(++)	(+++)	(+++)
Sonnenschein	Alcaloides	(+++)	(+++)	(+++)
Popoff	Alcaloides	(++)	(+++)	(+++)
Ninhidrina	Aminoácidos libres	(-)	(-)	(-)
Liberman-Buchardat	Triterpenoides esteroides, antronas	(-)	(-)	(+)
Bortranger	Naftoquinonas, antronas Antraquinonas	(-)	(-)	(-)
Gelatina	Taninos	(+++)	(++)	(+++)
Índice afrosimétrico	Saponinas	(-)	(-)	(-)

Leyenda: (+++) abundante; (++) bastante; (+) poca cantidad; (-) ausente

4.4. Análisis cromatográfico de los extractos hidroalcohólicos

4.4.1. Cromatografía en capa fina analítica

La Figura 25 muestra el resultado de la cromatografía en capa fina analítica, así como las distintas coloraciones obtenidas con el sistema de solvente cloroformo: metanol (3:1) y la aplicación de luz UV de 365 nm; con este sistema se observaron posibles componentes representados por cuatro fracciones para las hojas, tres para el tallo y tres para la raíz.

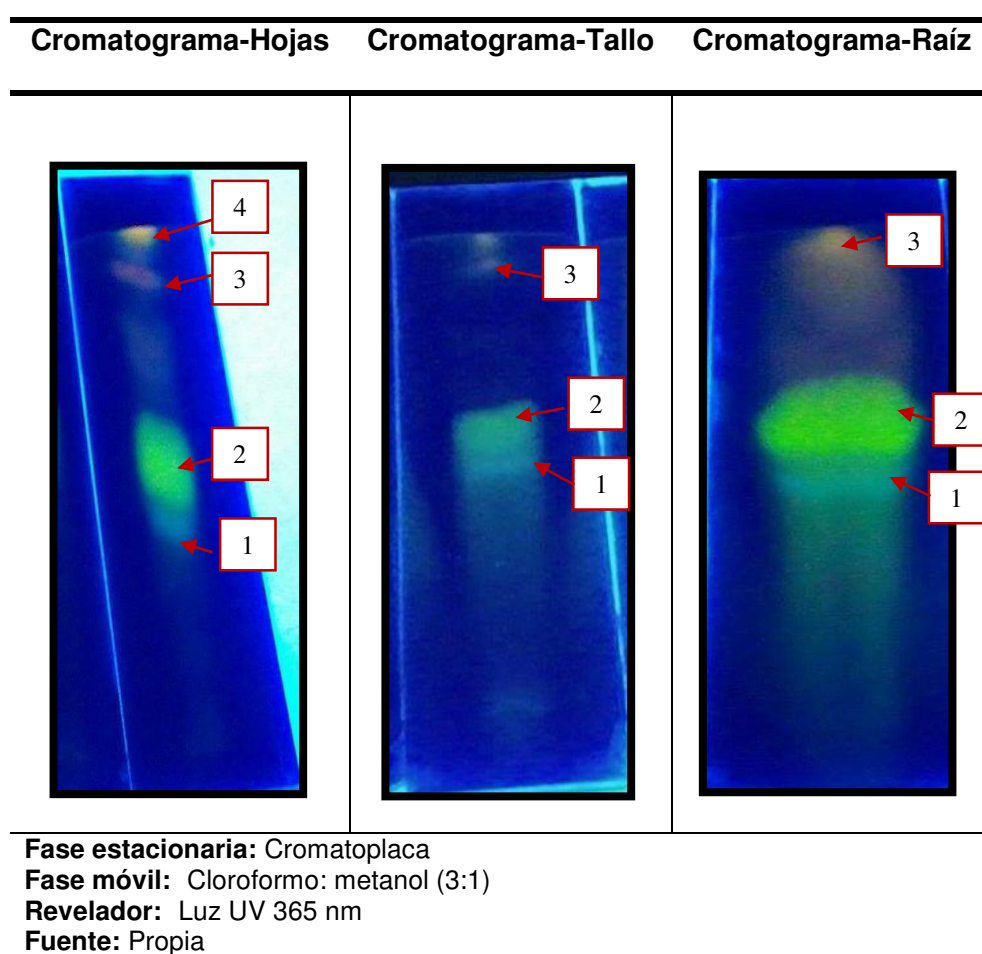


Figura 25. Cromatografía en capa fina analítica de los extractos hidroalcohólicos de **hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey (a).**

La Figura 26 muestra el resultado de la cromatografía en capa fina analítica donde se puede apreciar una única fracción, la misma que permaneció en el origen. Se empleó el sistema de solventes n-butanol: agua: hidróxido de amonio (**8:1:1**) y la aplicación de luz UV de 365 nm.

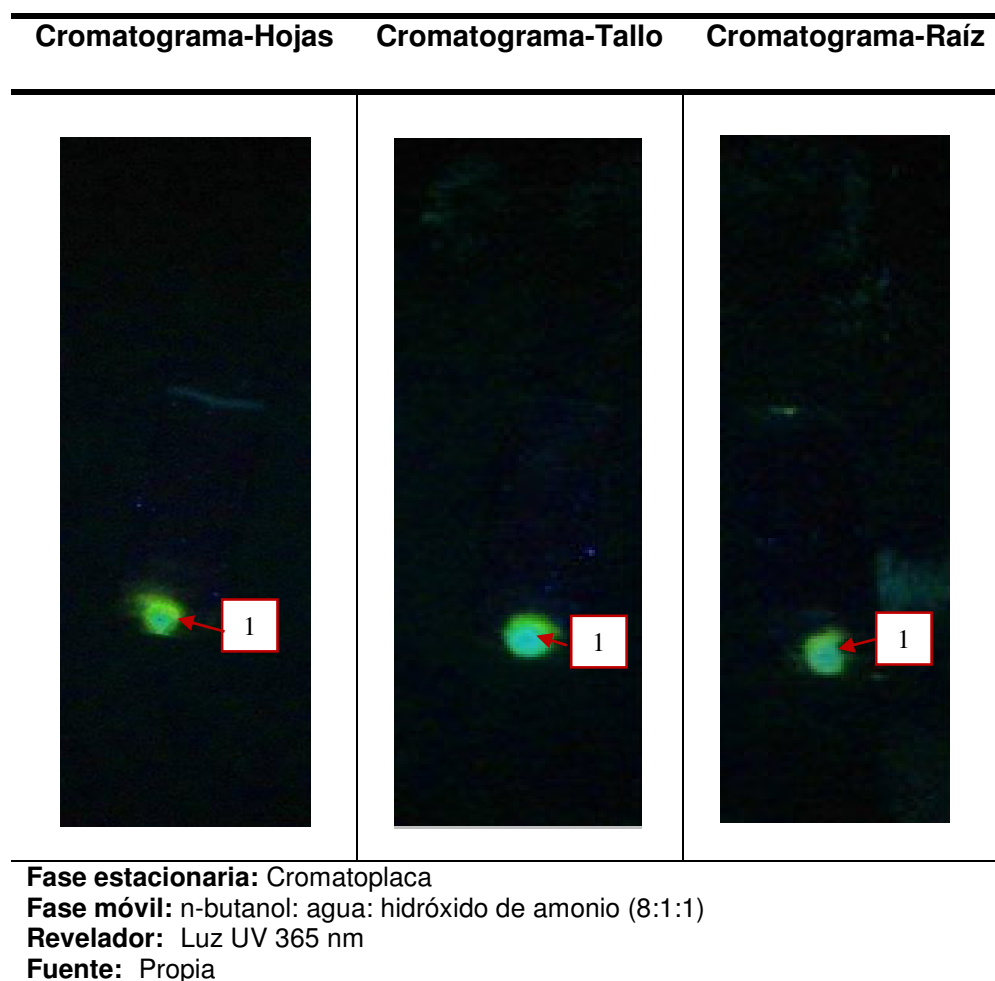
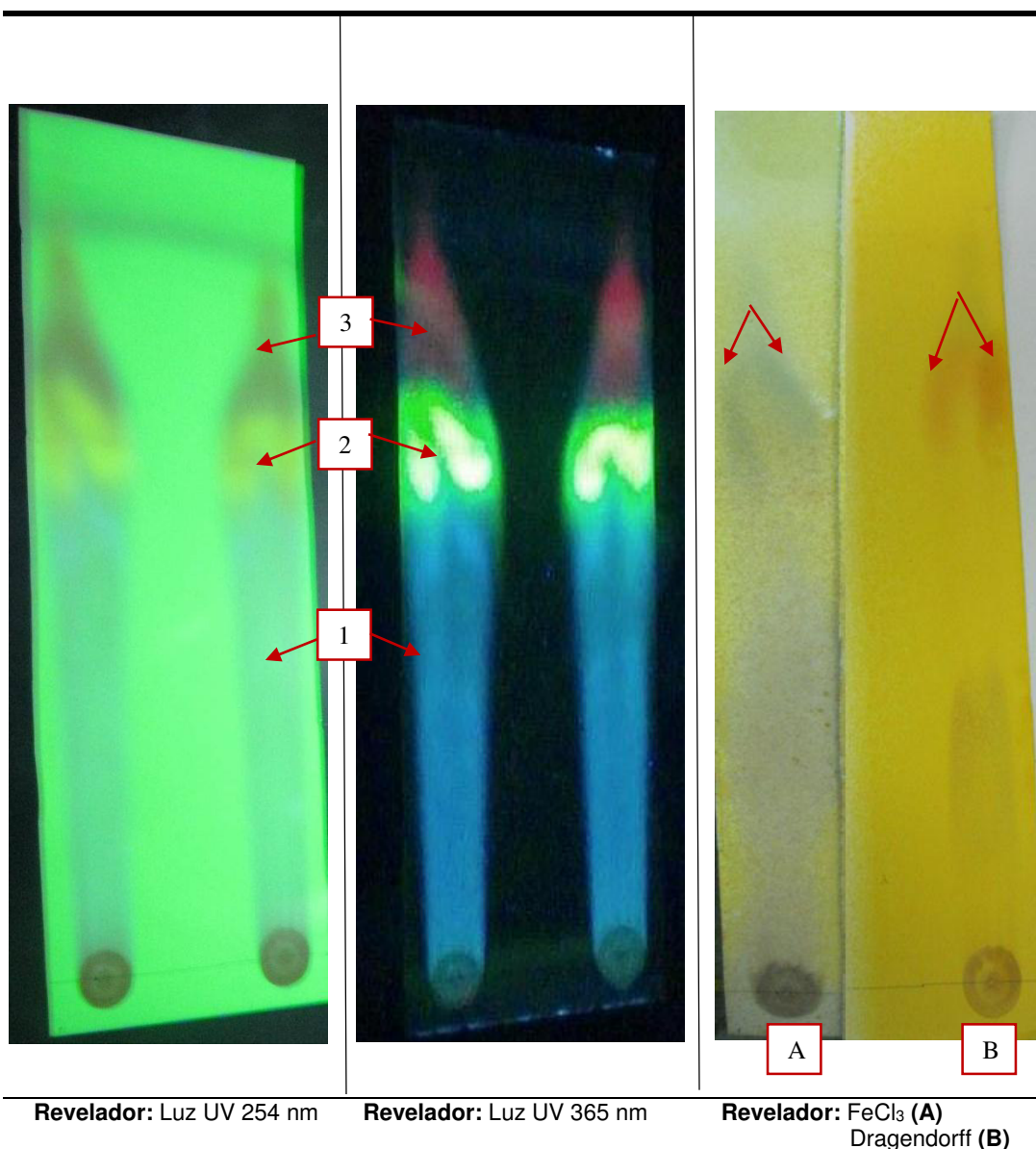


Figura 26. Cromatografía en capa fina analítica de los extractos hidroalcohólicos de **hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey (b).**

Las Figuras 27-29 se muestran los resultados de la cromatografía en capa fina analítica, así como las distintas coloraciones obtenidas con el sistema de solvente acetato de etilo: etanol (**30:10**) y reveladores tricloruro de hierro, Dragendorff y luz UV.

Cromatograma-Hojas



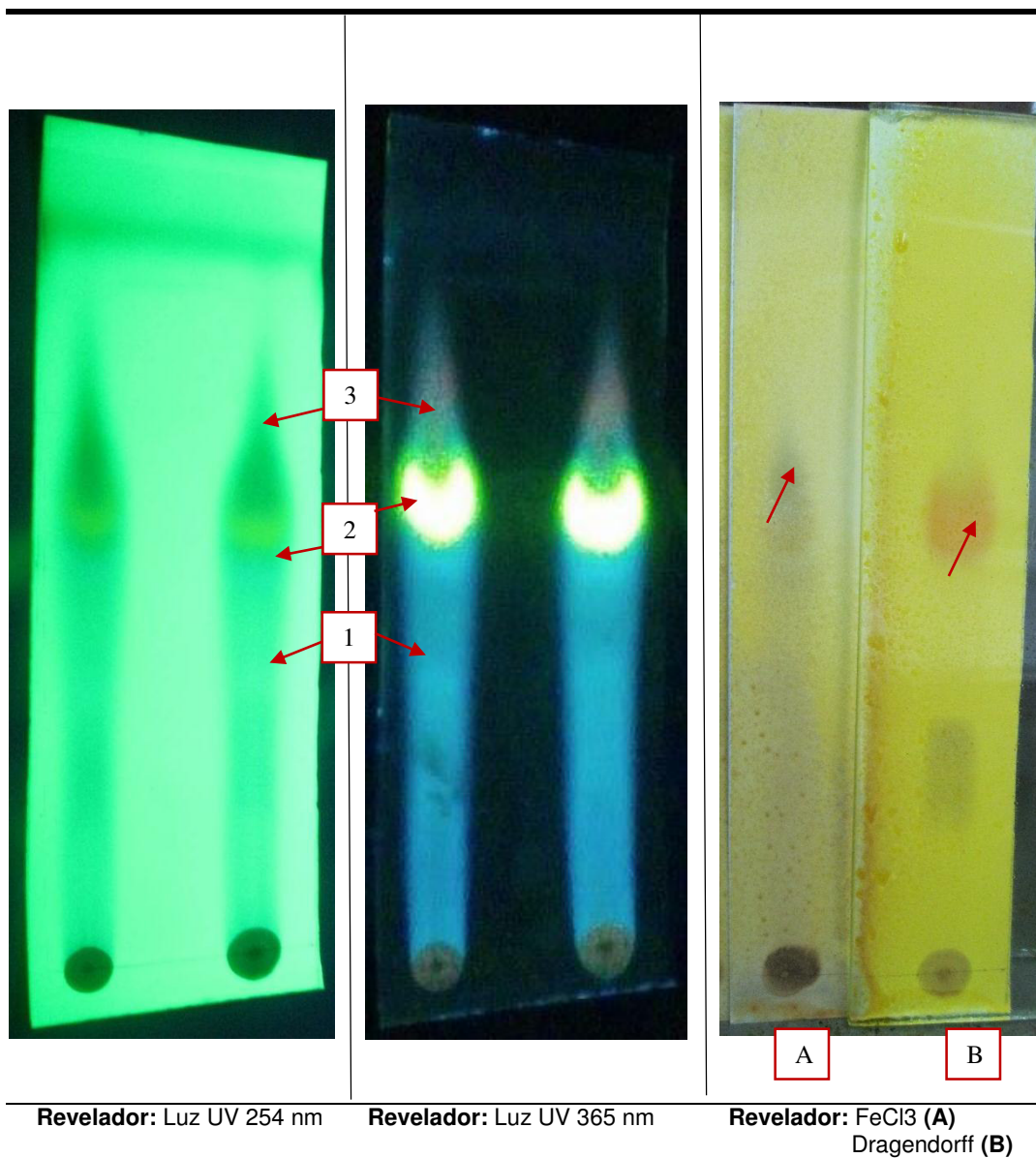
Fase estacionaria: Cromatofolio

Fase móvil: Acetato de etilo: etanol (30:10)

Fuente: Propia

Figura 27. Cromatografía en capa fina analítica del extracto hidroalcohólico de **hojas** de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey.

Cromatograma-Tallo



Fase estacionaria: Cromatofolio
Fase móvil: Acetato de etilo: etanol (30:10)
Fuente: Propia

Figura 28. Cromatografía en capa fina analítica del extracto hidroalcohólico de tallo de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownb.

4.4.2. Cromatografía en capa fina preparativa

En la cromatografía en capa fina preparativa se empleó el sistema de solventes cloroformo: metanol (30:10) y revelador luz UV, los resultados mostraron que en la especie vegetal hay posibles componentes representados por 12 fracciones para las hojas, 10 fracciones para el tallo y 10 fracciones para la raíz (Figura 30).

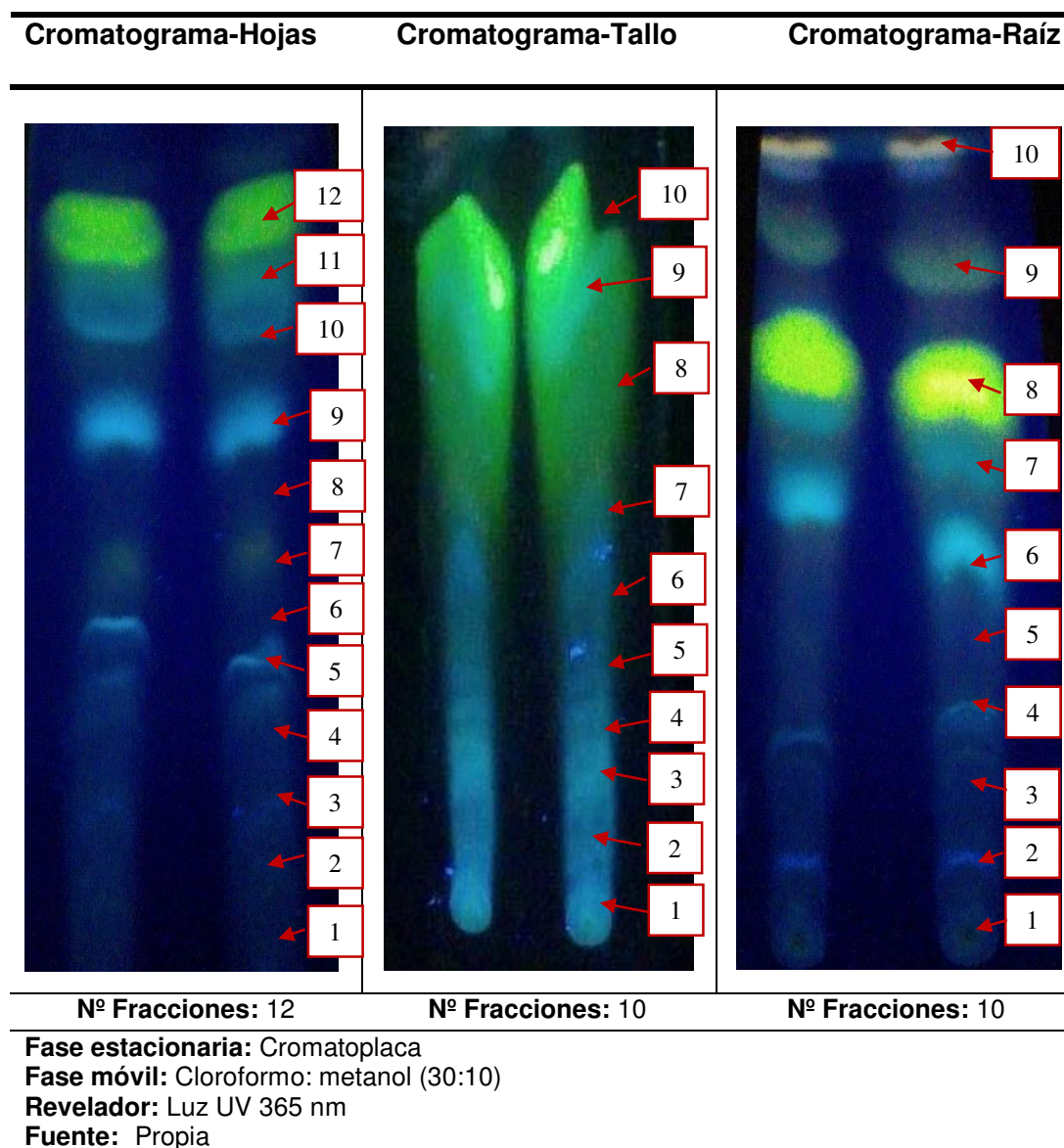
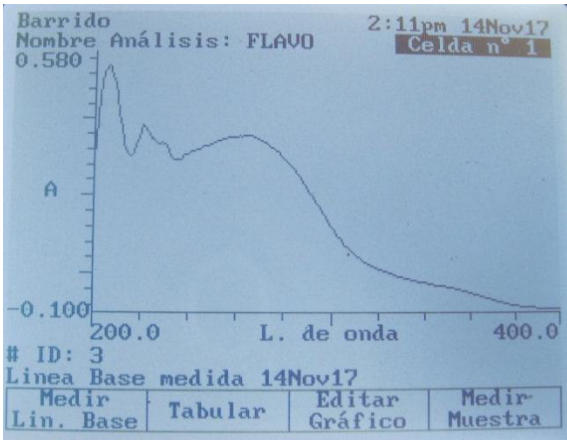
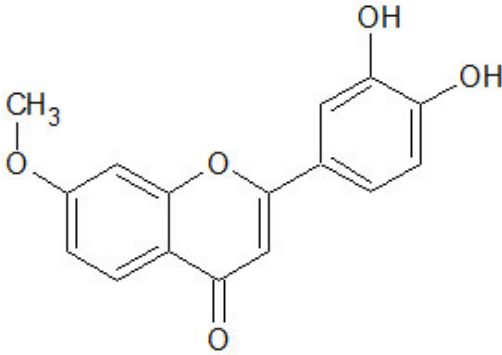


Figura 30. Cromatografía en capa fina preparativa de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey.

4.5. Espectroscopía UV-Visible

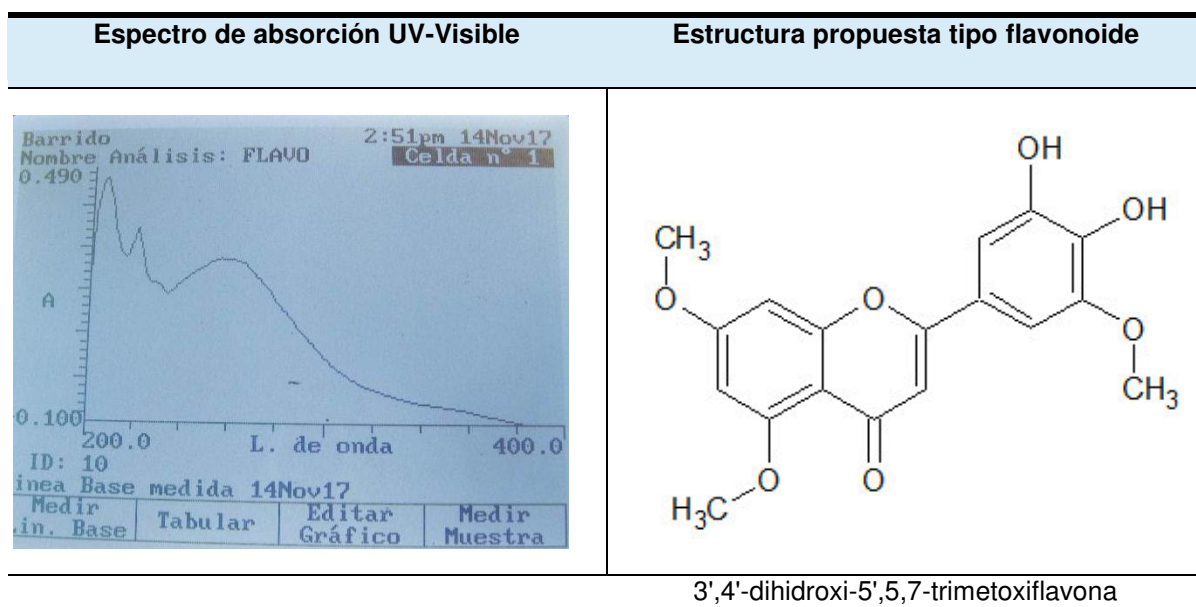
En la Figura 30 se muestra las fracciones encontradas en cromatografía en capa fina preparativa, las mismas que fueron leídas en el espectrofotómetro UV-Visible en etanol a un rango de longitud de onda comprendida entre 200 y 400 nm y en las Figuras 31-37 se propone las siguientes estructuras de tipo flavonoides.

Espectro de absorción UV-Visible	Estructura propuesta tipo flavonoide
	 <p data-bbox="987 1098 1333 1129">3',4'-dihidroxi-7metoxiflavona</p>

Fuente: **propia**

$\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}}$ 263, 350 nm

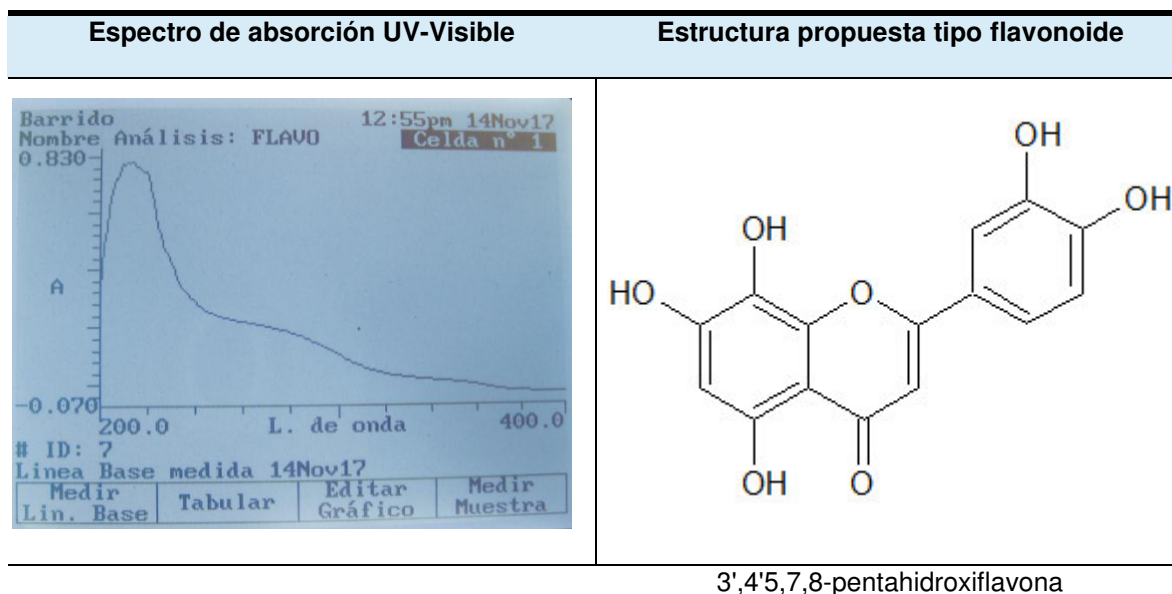
Figura 31. Espectro de absorción de la **Fracción 7** del extracto hidroalcohólico de **hojas de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey (a).**



Fuente: **propia**

$\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}}$ 265, 352 nm

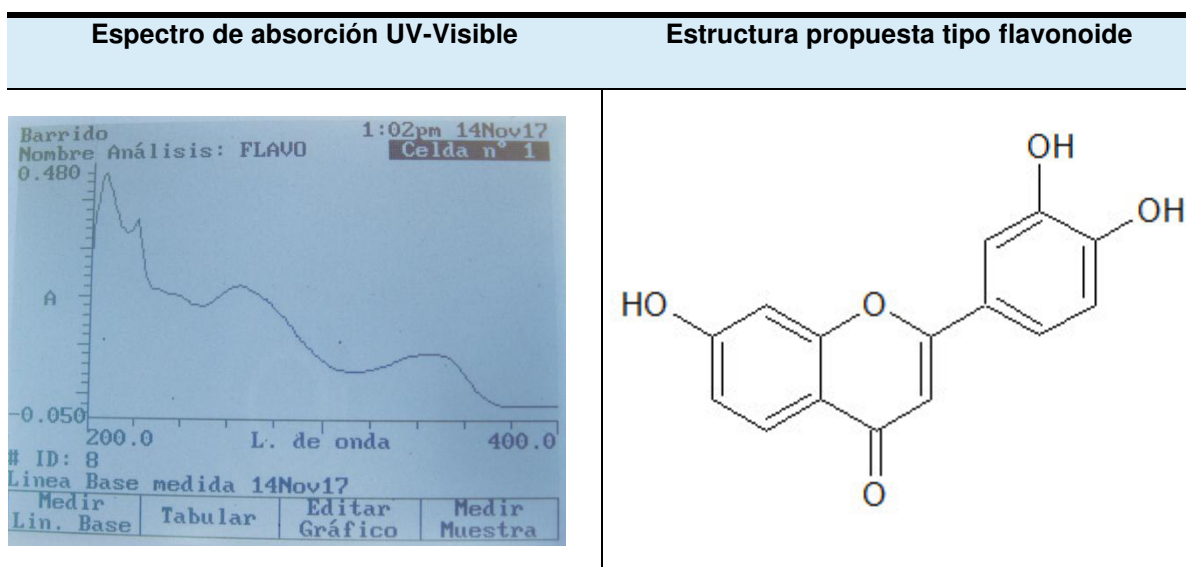
Figura 32. Espectro de absorción de la **Fracción 11** del extracto hidroalcohólico de **hojas de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey (b).**



Fuente: **propia**

$\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}}$ 282, 349 nm

Figura 33. Espectro de absorción de la **Fracción 6** del extracto hidroalcohólico de **tallo de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey (a).**

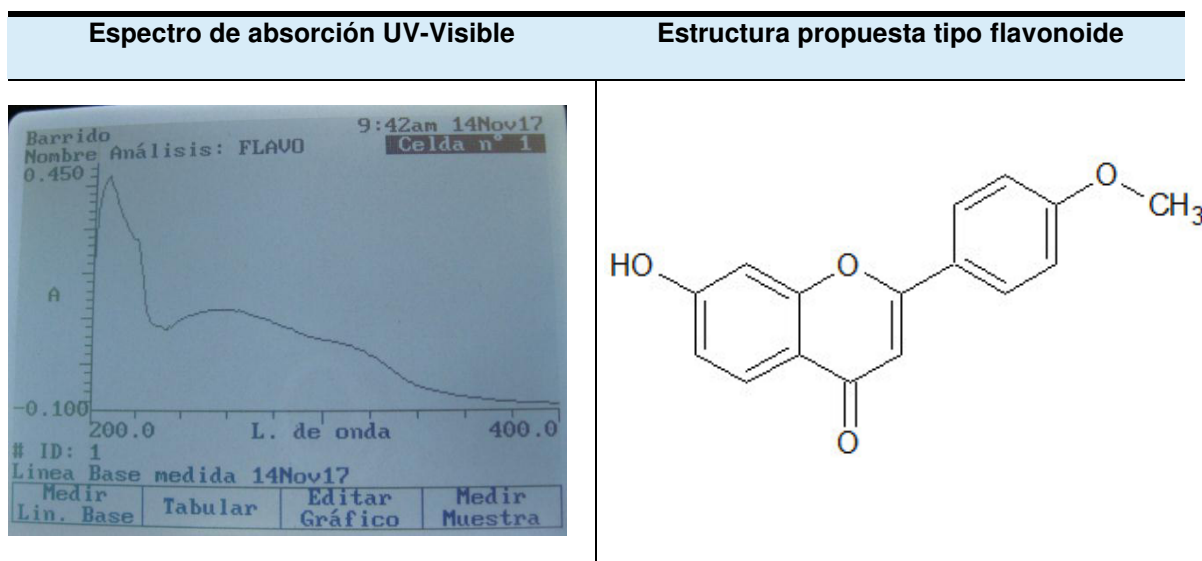


3',4',7-trihidroxi flavona

Fuente: **propia**

$\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}}$ 267, 348 nm

Figura 34. Espectro de absorción de la **Fracción 9** del extracto hidroalcohólico de **tallo de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey (b).**

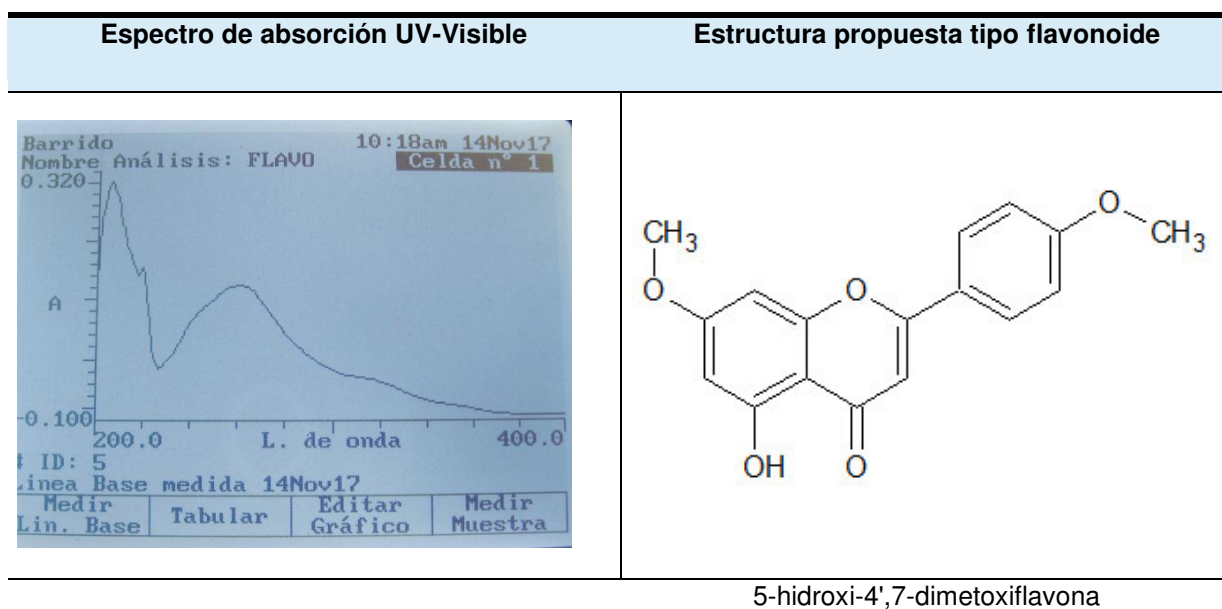


7-hidroxi-4'-metoxi flavona

Fuente: **propia**

$\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}}$ 264, 318 nm

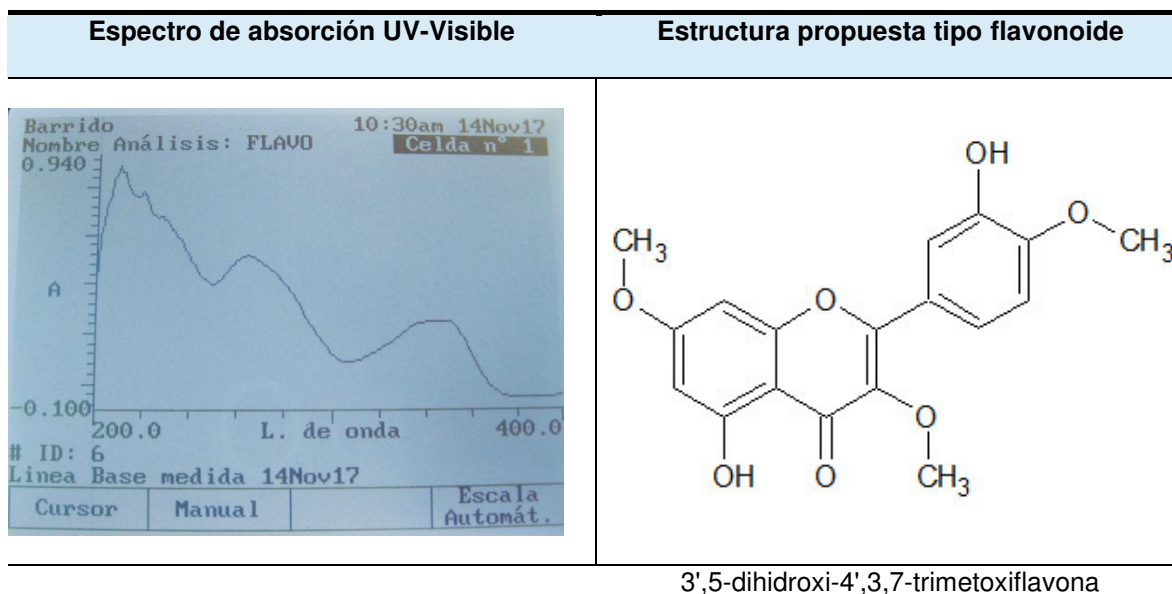
Figura 35. Espectro de absorción de la **Fracción 2** del extracto hidroalcohólico de **raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey (a).**



Fuente: **propia**

$\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}}$ 267, 318 nm

Figura 36. Espectro de absorción de la **Fracción 5** del extracto hidroalcohólico de raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey (b).



Fuente: **propia**

$\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}}$ 267, 349 nm

Figura 37. Espectro de absorción de la **Fracción 6** del extracto hidroalcohólico de raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey (c).

4.6. Cuantificación de compuestos fenólicos totales

En la Tabla 11 se presenta las absorbancias a 765 nm de las soluciones de ácido gálico patrón, con estos datos se elaboró la curva de calibración del ácido gálico usándolo como patrón de referencia para la determinación de compuestos fenólicos totales (Figura 38).

Tabla 11. Absorbancias promedio del estándar de ácido gálico a 765 nm

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancias promedio del patrón ácido gálico \pm DE*
1	0.121 \pm 0.003
2	0.233 \pm 0.001
4	0.444 \pm 0.002
6	0.651 \pm 0.001

*Los valores representan el promedio de tres repeticiones \pm la desviación estándar (DE).

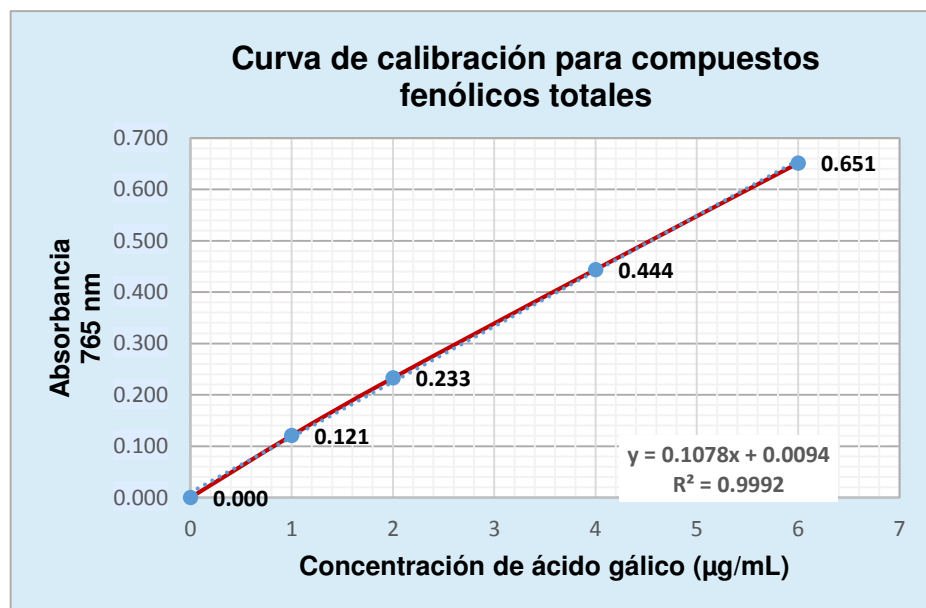


Figura 38. Curva de calibración concentración-absorbancia del ácido gálico para la cuantificación de compuestos fenólicos totales ($R^2=0.9992$).

En la Tabla 12 se muestran las absorbancias a 765 nm de los extractos hidroalcohólicos de las hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey.

Tabla 12. Absorbancia promedio de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey a 765 nm

Extracto Hidroalcohólico de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey	Absorbancia promedio a 765 nm \pm DE*
Hoja	0.407 \pm 0.001
Tallo	0.364 \pm 0.001
Raíz	0.201 \pm 0.001

*Los valores representan el promedio de tres repeticiones \pm la desviación estándar (DE).

Los resultados de la cuantificación de compuestos fenólicos totales por el método de Folin-Ciocalteu se muestran en la Tabla 13, donde el tallo tiene entre 7.61 y 16.54 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco más que las hojas y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey respectivamente. Luego, en la última columna se muestra las concentraciones de ácido gálico por gramo de extracto seco.

Tabla 13. Contenido de compuestos fenólicos totales en cada extracto hidroalcohólico de hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey

Extracto Hidroalcohólico de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey	Compuestos fenólicos totales	
	mg EAG/g ES \pm DE*	Concentración de AG \pm DE*
Hoja	17.68 \pm 0.10	103.93 \pm 0.57 μ mol AG/g ES
Tallo	25.29 \pm 0.07	148.64 \pm 0.43 μ mol AG/g ES
Raíz	8.75 \pm 0.02	51.46 \pm 0.14 μ mol AG/g ES

*Los valores representan el promedio de tres repeticiones \pm la desviación estándar (DE).

Del análisis estadístico ANOVA se acepta la hipótesis alternativa debido a que al menos uno de los promedios de los resultados de la determinación de compuestos fenólicos totales de las partes de la planta (hojas, tallo y raíz) presenta diferencia estadísticamente significativa y de la prueba de Tukey se acepta que hay diferencia significativa entre las tres partes de la planta con un intervalo de confianza al 95%.

4.7. Cuantificación de flavonoides totales

En la Tabla 14 se observa las absorbancias del estándar quercetina (100 µg/mL) y de las muestras de hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey.

Tabla 14. Absorbancia promedio de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey y el estándar de quercetina a 432 nm

Extracto Hidroalcohólico de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey	Absorbancia promedio a 432 nm \pm DE*
Hoja	0.122 \pm 0.001
Tallo	0.082 \pm 0.003
Raíz	0.063 \pm 0.005
Absorbancias promedio Patrón quercetina a 432 nm	0.858\pm0.003

*Los valores representan el promedio de tres repeticiones \pm la desviación estándar (DE).

Los resultados de la cuantificación de flavonoides totales se muestran en la Tabla 15, donde las hojas tienen entre 516.35 y 654.16 µg equivalentes de quercetina por gramo de extracto seco más que el tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey, luego se muestra la concentración de quercetina por gramo de extracto seco.

Tabla 15. Contenido de flavonoides totales en cada extracto hidroalcohólico de hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey

Extracto Hidroalcohólico de <i>Argemone subfusiformis</i> G.B. Ownbey	Flavonoides totales	
	µg EQ/g ES \pm DE*	Concentración de Q \pm DE*
Hoja	708.33 \pm 6.76	2.34 \pm 0.02 µmol Q/g ES
Tallo	191.98 \pm 6.14	0.64 \pm 0.02 µmol Q/g ES
Raíz	54.17 \pm 3.87	0.18 \pm 0.01 µmol Q/g ES

*Los valores representan el promedio de tres repeticiones \pm la desviación estándar (DE).

Del análisis estadístico ANOVA se acepta la hipótesis alternativa debido a que al menos uno de los promedios de los resultados de la determinación de flavonoides totales de las partes de la planta (hojas, tallo y raíz) presenta diferencia estadísticamente significativa y de la prueba de Tukey se acepta que hay diferencia significativa entre las tres partes de la planta con un intervalo de confianza al 95%.

En las Figuras 39 y 40 se muestran los comparativos de los contenidos de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales respectivamente, donde podemos observar que el tallo tiene mayor contenido de compuestos fenólicos en comparación que las hojas y raíz; sin embargo, las hojas tienen mayor contenido de flavonoides en comparación con el tallo y raíz (Anexo N°7).

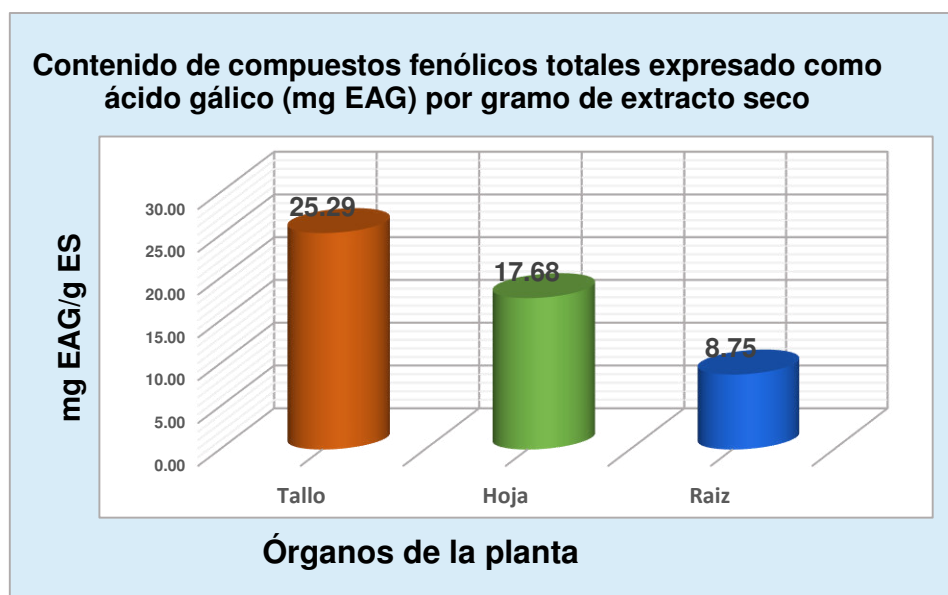


Figura 39. Comparativo del contenido de compuestos fenólicos totales en cada extracto hidroalcohólico de hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey.

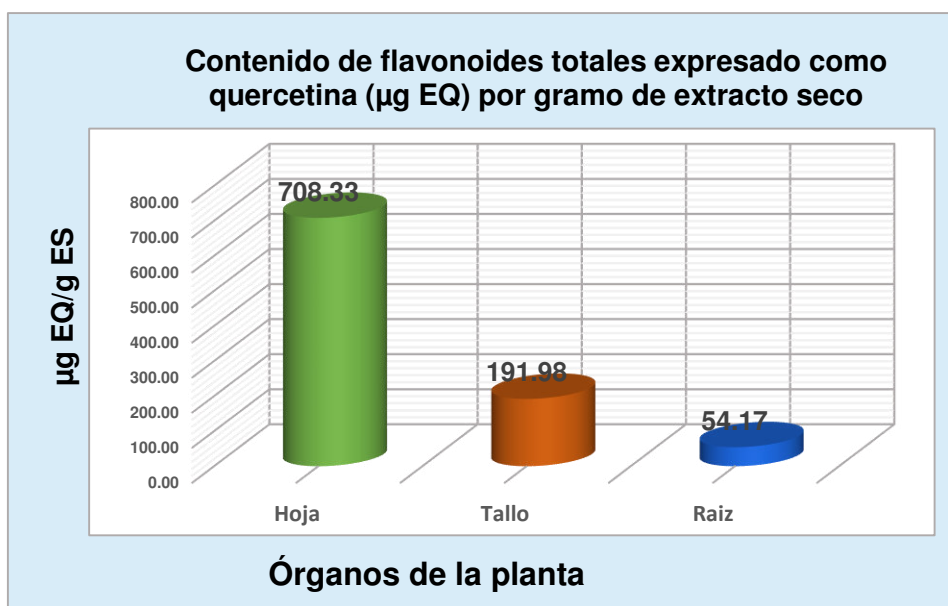


Figura 40. Comparativo del contenido de flavonoides totales en cada extracto hidroalcohólico de hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey.

4.8. Actividad antioxidante

4.8.1. Actividad antioxidante empleando el radical DPPH

En las Tablas 16-18 y Figuras 41-43 se presentan las absorbancias de la actividad antioxidante por el método-DPPH y porcentaje de inhibición del radical libre para cada concentración del extracto hidroalcohólico de hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey, además de los valores de IC₅₀.

Tabla 16. Absorbancias promedio y porcentaje de Inhibición de radicales libres del extracto hidroalcohólico de **hojas de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey**

Concentración de la sustancia antioxidante (µg/mL)	Absorbancia promedio a 517 nm ± DE*	% Inhibición DPPH
0	0.606±0.001	0.00%
120	0.524±0.002	13.48%
240	0.459±0.004	24.34%
360	0.387±0.005	36.08%
480	0.325±0.003	46.40%
600	0.266±0.001	56.08%
IC ₅₀ (µg/mL): 497.52±1.21		

*Los valores representan el promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar (DE).

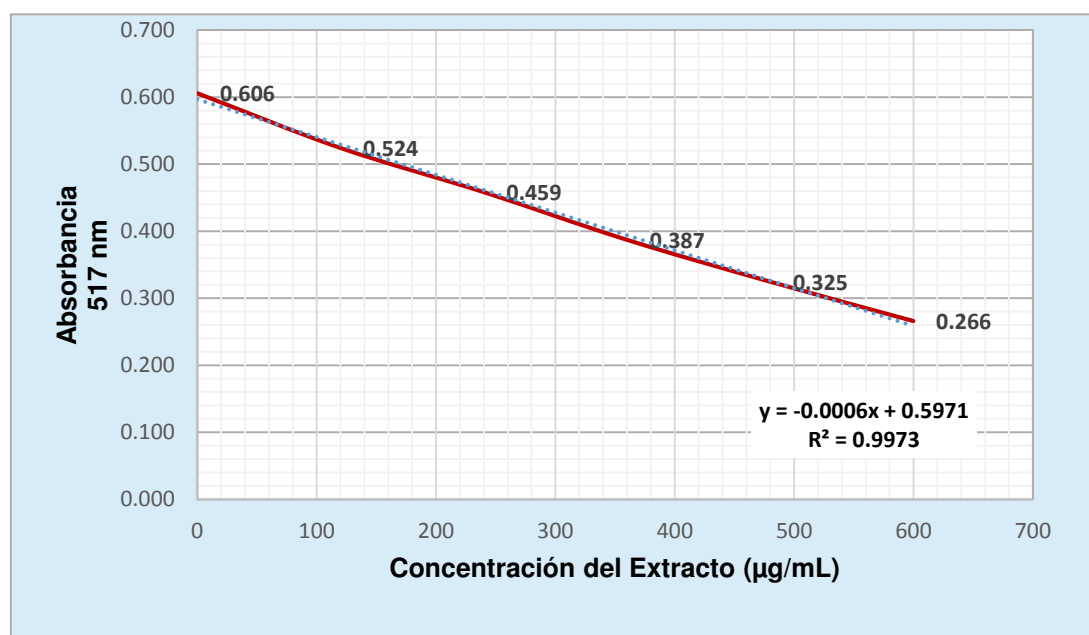


Figura 41. Curva concentración-absorbancia del extracto hidroalcohólico de **hojas de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey** (R²=0.9973).

Tabla 17. Absorbancias promedio y porcentaje de Inhibición de radicales libres del extracto hidroalcohólico de **tallo de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey**

Concentración de la sustancia antioxidante (µg/mL)	Absorbancia promedio a 517 nm ± DE*	% Inhibición DPPH
0	0.605±0.002	0.00%
100	0.494±0.003	18.32%
200	0.399±0.003	34.03%
300	0.310±0.002	48.75%
400	0.227±0.001	62.44%
IC₅₀(µg/mL): 330.48±1.09		

*Los valores representan el promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar (DE).

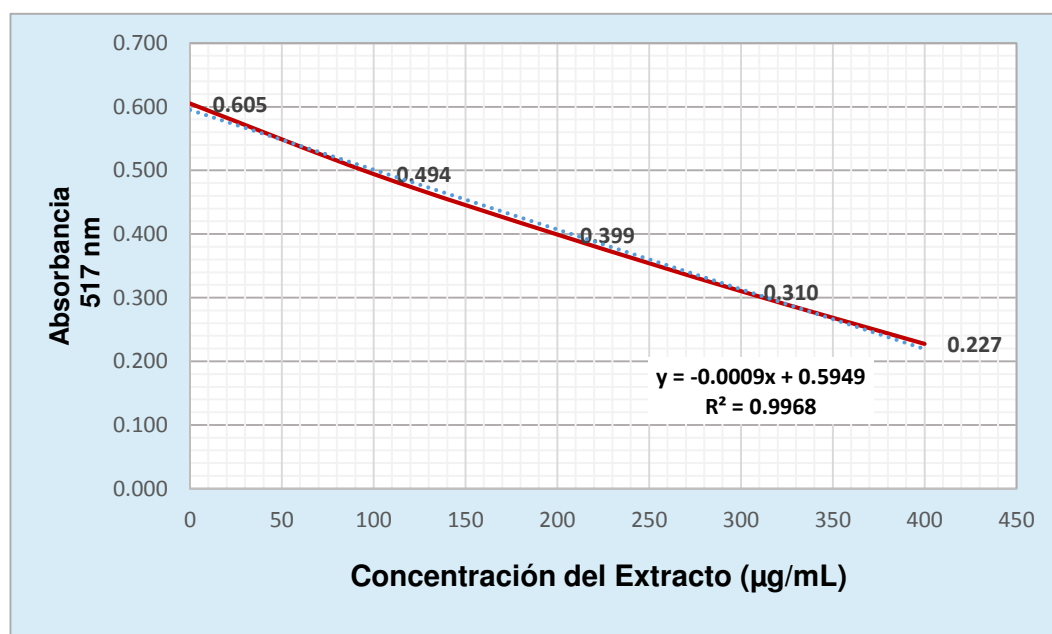


Figura 42. Curva concentración-absorbancia del extracto hidroalcohólico de **tallo de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey** ($R^2=0.9968$).

Tabla 18. Absorbancias promedio y porcentaje de Inhibición de radicales libres del extracto hidroalcohólico de raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey

Concentración de la sustancia antioxidante (µg/mL)	Absorbancia promedio a 517 nm ± DE*	% Inhibición DPPH
0	0.610±0.006	0.00%
300	0.527±0.001	13.58%
600	0.440±0.005	27.92%
900	0.353±0.007	42.12%
1200	0.272±0.008	55.50%
IC ₅₀ (µg/mL): 1017.83±3.11		

*Los valores representan el promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar (DE).

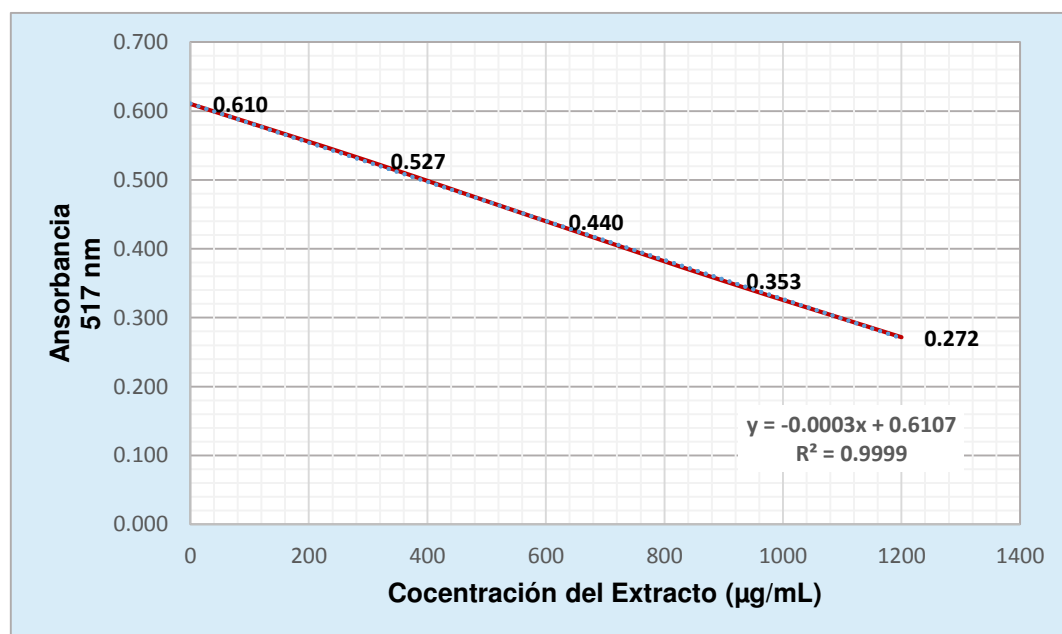


Figura 43. Curva concentración-absorbancia del extracto hidroalcohólico de raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey ($R^2=0.9999$).

A continuación, en la Tabla 19 y Figura 44 se presentan las absorbancias a 517 nm de la solución patrón Trolox y su IC₅₀. Con estos datos se elaboró la curva de calibración respectiva.

Tabla 19. Absorbancias promedio y porcentaje de Inhibición de radicales libres de la solución patrón **Trolox** por el método **DPPH**

Concentración de la sustancia antioxidante (µg/mL)	Absorbancia promedio a 517 nm ± DE*	% Inhibición DPPH
0	0.610±0.001	0.00%
1	0.530±0.009	13.11%
2	0.430±0.016	29.45%
3	0.339±0.022	44.43%
4	0.236±0.002	61.37%
5	0.142±0.005	76.67%
IC ₅₀ (µg/mL): 3.26±0.05		

*Los valores representan el promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar (DE).

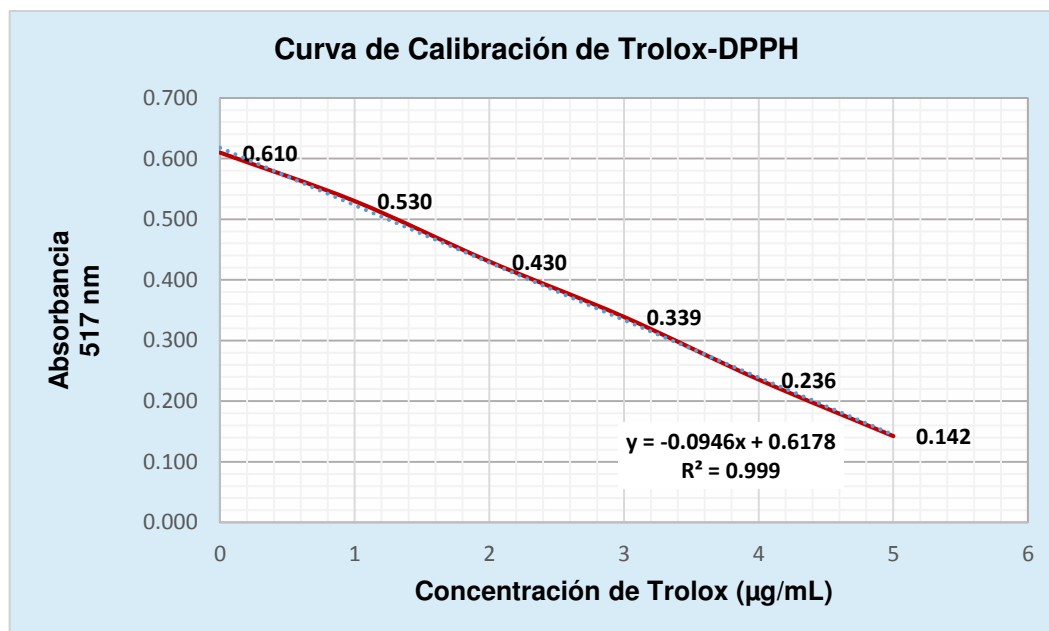


Figura 44. Curva de calibración concentración-absorbancia para la solución patrón **Trolox-DPPH** ($R^2=0.999$).

Tabla 20. Cuadro comparativo de IC₅₀ y TEAC de los extractos hidroalcohólicos de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey

Muestras	IC ₅₀ (µg/mL) ± DE*	TEAC-DPPH ± DE*
Hoja	497.52±1.21	6.6x10 ⁻³ ±0.02 µg ET/µg ES
Tallo	330.48±1.09	9.9x10 ⁻³ ±0.03 µg ET/µg ES
Raíz	1017.83±3.11	3.2x10 ⁻³ ±0.01 µg ET/µg ES
Trolox	3.26±0.05	

*Los valores representan el promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar (DE).

Se puede observar en la Tabla 20 que los valores de IC₅₀ y TEAC de los extractos hidroalcohólicos estudiados, muestran que el potencial antioxidante es mayor en el tallo que en las hojas y raíz.

Del análisis estadístico ANOVA se acepta la hipótesis alternativa debido a que al menos uno de los promedios de los resultados de la determinación de TEAC-DPPH de las partes de la planta (hojas, tallo y raíz) presenta diferencia estadísticamente significativa y de la prueba de Tukey se acepta que hay diferencia significativa entre las tres partes de la planta con un intervalo de confianza al 95%.

En las Figuras 45 y 46 se muestran los comparativos de los IC_{50} y TEAC-DPPH, donde se puede observar que a menor valor de IC_{50} es mayor la actividad antioxidante, en contraste a mayor valor de TEAC-DPPH mayor su actividad antioxidante (Anexo N°8).

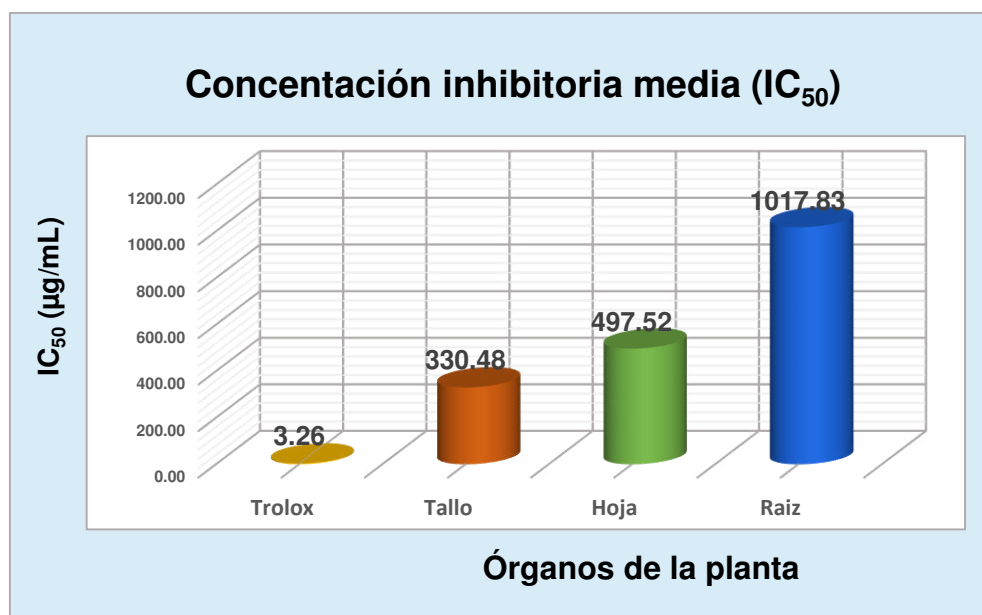


Figura 45. Comparativo de IC_{50} de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey por el **método DPPH**.

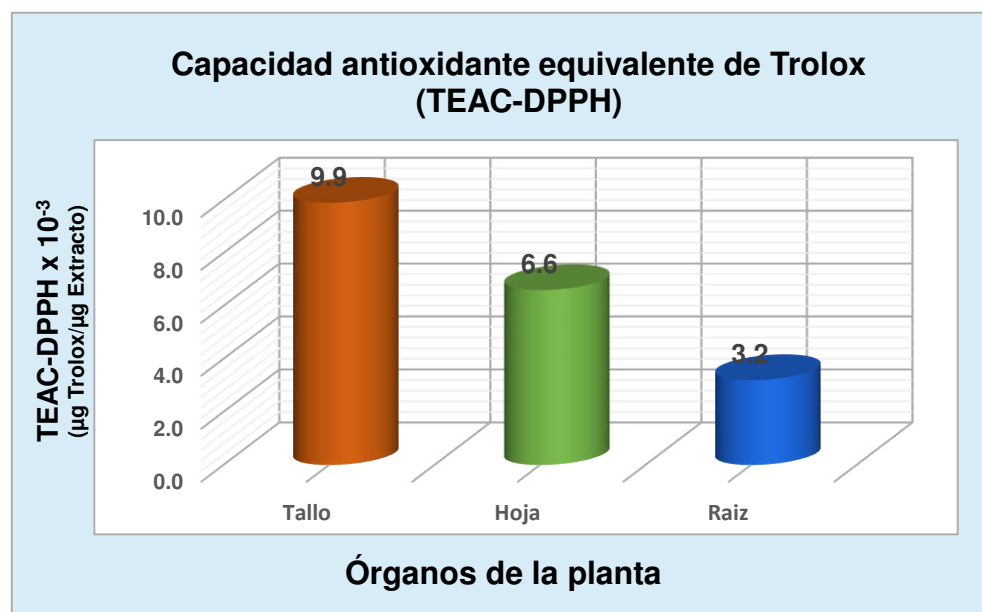


Figura 46. Comparativo de TEAC de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey por el **método DPPH**.

4.8.2. Actividad antioxidante empleando el radical ABTS^{•+}

En las Tablas 21-23 y Figuras 47-49 se presentan las absorbancias de la actividad antioxidante por el método-ABTS^{•+} y porcentaje de inhibición del radical libre para cada concentración de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey, además de los valores de IC₅₀.

Tabla 21. Absorbancias promedio y porcentaje de Inhibición de radicales libres del extracto hidroalcohólico de **hojas de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey**

Concentración de la sustancia antioxidante (µg/mL)	Absorbancias promedio a 734 nm ± DE*	% Inhibición ABTS ^{•+}
0	0.703±0.003	0.00%
40	0.608±0.004	13.57%
80	0.529±0.002	24.75%
120	0.457±0.007	35.04%
160	0.387±0.005	45.00%
200	0.322±0.006	54.22%
240	0.240±0.001	65.86%
IC ₅₀ (µg/mL): 181.27±0.84		

*Los valores representan el promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar (DE).

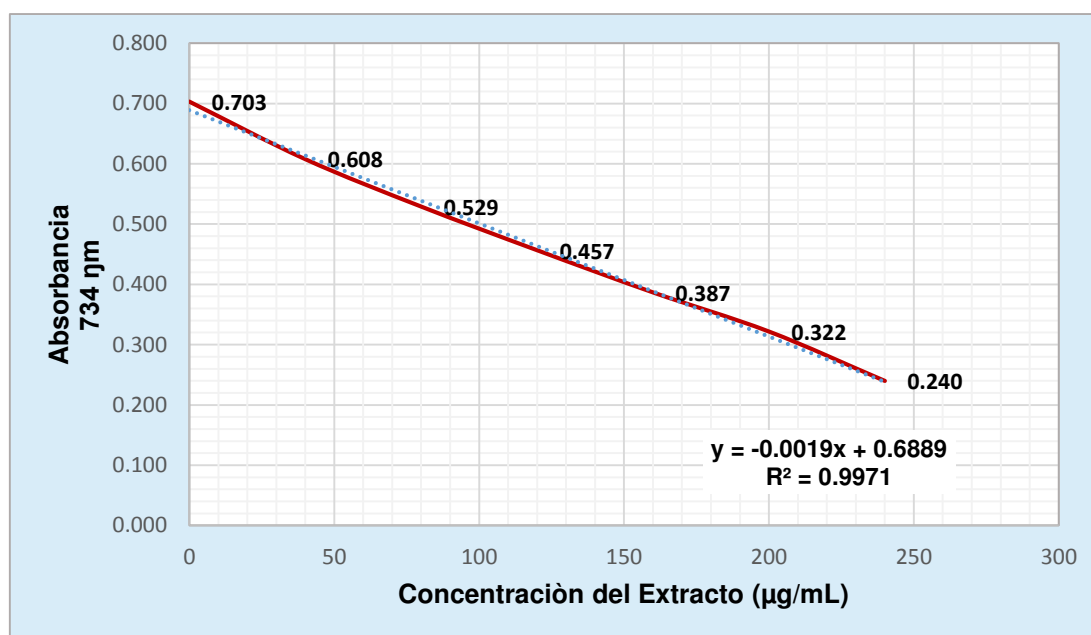


Figura 47. Curva concentración-absorbancia del extracto hidroalcohólico de **hojas de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey** ($R^2=0.9971$).

Tabla 22. Absorbancias promedio y porcentaje de Inhibición de radicales libres del extracto hidroalcohólico de **tallo de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey**

Concentración de la sustancia antioxidante (µg/mL)	Absorbancias promedio a 734 nm ± DE*	% Inhibición ABTS•+
0	0.695±0.001	0.00%
30	0.600±0.001	13.71%
60	0.527±0.003	24.23%
90	0.451±0.001	35.19%
120	0.378±0.005	45.64%
150	0.313±0.002	54.96%
IC₅₀(µg/mL): 136.70±0.24		

*Los valores representan el promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar (DE).

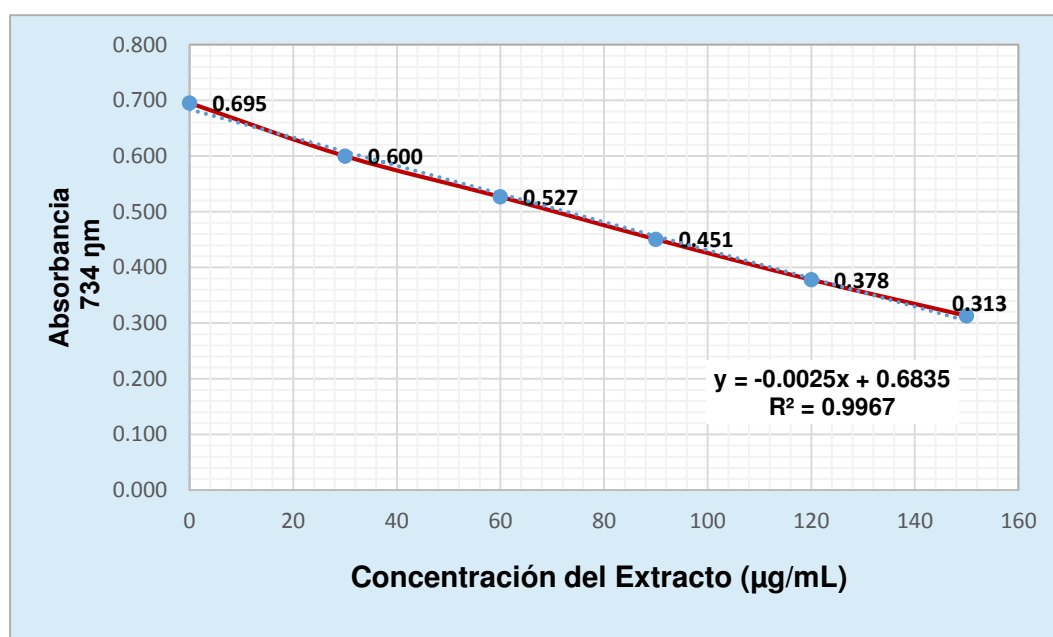


Figura 48. Curva concentración-absorbancia del extracto hidroalcohólico de **tallo de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey** ($R^2=0.9967$).

Tabla 23. Absorbancias promedio y porcentaje de Inhibición de radicales libres del extracto hidroalcohólico de raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey

Concentración de la sustancia antioxidante (µg/mL)	Absorbancias promedio a 734 nm ± DE*	% Inhibición ABTS•+
0	0.694±0.001	0.00%
100	0.575±0.002	17.06%
200	0.481±0.003	30.68%
300	0.377±0.001	45.60%
400	0.285±0.008	58.94%
500	0.195±0.003	71.84%
IC₅₀(µg/mL): 341.60±0.95		

*Los valores representan el promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar (DE).

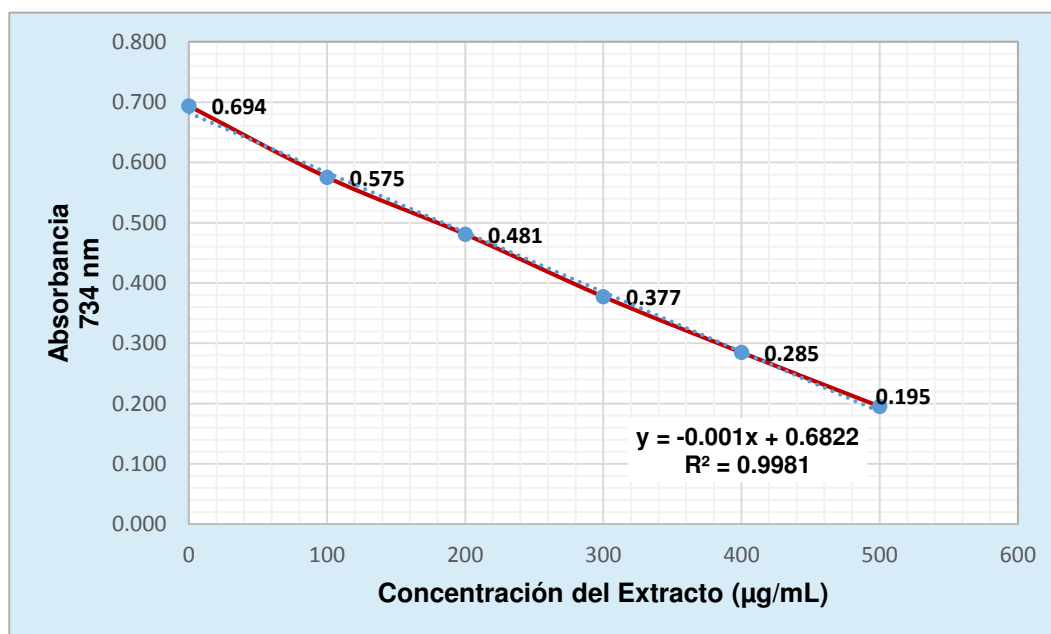


Figura 49. Curva concentración-absorbancia del extracto hidroalcohólico de raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey ($R^2=0.9981$).

A continuación, en la Tabla 24 y Figura 50 se presentan las absorbancias a 734 nm de la solución patrón Trolox y su IC₅₀. Con estos datos se elaboró la curva de calibración respectiva.

Tabla 24. Absorbancias promedio y porcentaje de Inhibición de radicales libres de la solución patrón **Trolox** por el método **ABTS^{•+}**

Concentración de la sustancia antioxidante (µg/mL)	Absorbancias promedio a 734 nm ± DE*	% Inhibición ABTS ^{•+}
0	0.694±0.004	0.00%
1	0.584±0.001	15.94%
2	0.465±0.010	32.98%
3	0.345±0.012	50.31%
4	0.228±0.012	67.16%
5	0.111±0.013	83.97%
IC ₅₀ (µg/mL): 2.98±0.08		

*Los valores representan el promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar (DE).

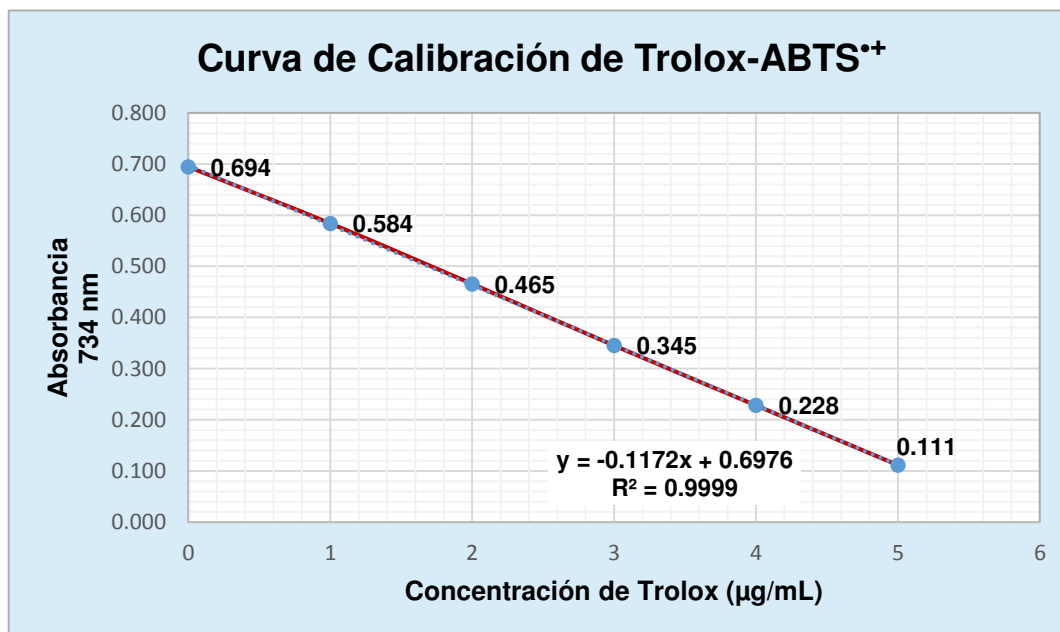


Figura 50. Curva de calibración concentración-absorbancia para la solución patrón Trolox- ABTS^{•+} (R²=0.9999).

Tabla 25. Cuadro comparativo de IC₅₀ y TEAC de los extractos hidroalcohólicos de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey

Muestras	IC ₅₀ (µg/mL) ± DE*	TEAC- ABTS** ± DE*
Hoja	181.27±0.84	16.4x10 ⁻³ ±0.01 µg ET/µg ES
Tallo	136.70±0.24	21.7x10 ⁻³ ±0.01 µg ET/µg ES
Raíz	341.60±0.95	8.7x10 ⁻³ ±0.02 µg ET/µg ES
Trolox	2.98±0.08	

*Los valores representan el promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar (DE).

Se puede observar en la Tabla 25 que los valores de IC₅₀ y TEAC de los extractos hidroalcohólicos estudiados, muestran que el potencial antioxidante es mayor en el tallo que en las hojas y raíz.

Del análisis estadístico ANOVA se acepta la hipótesis alternativa debido a que al menos uno de los promedios de los resultados de la determinación de TEAC- ABTS** de las partes de la planta (hojas, tallo y raíz) presenta diferencia estadísticamente significativa y de la prueba de Tukey se acepta que hay diferencia significativa entre las tres partes de la planta con un intervalo de confianza al 95%.

En las Figuras 51 y 52 se muestran los comparativos de los IC_{50} y TEAC- ABTS⁺⁺, donde se puede observar que a menor valor de IC_{50} es mayor la actividad antioxidante, en contraste a mayor valor de TEAC-ABTS⁺⁺ mayor su actividad antioxidante (Anexo N°8).

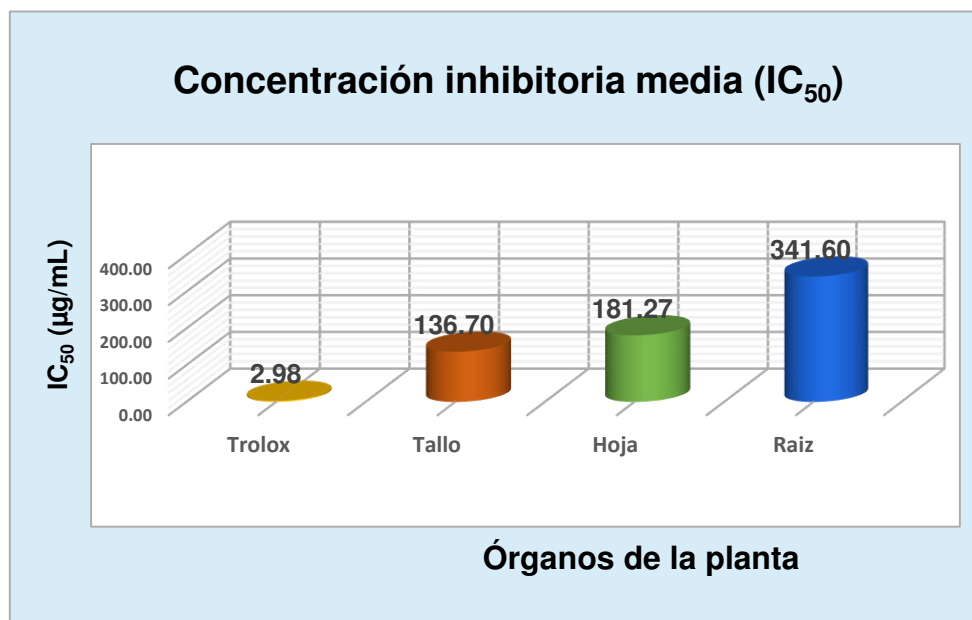


Figura 51. Comparativo de IC_{50} de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey por el **método ABTS⁺⁺**.

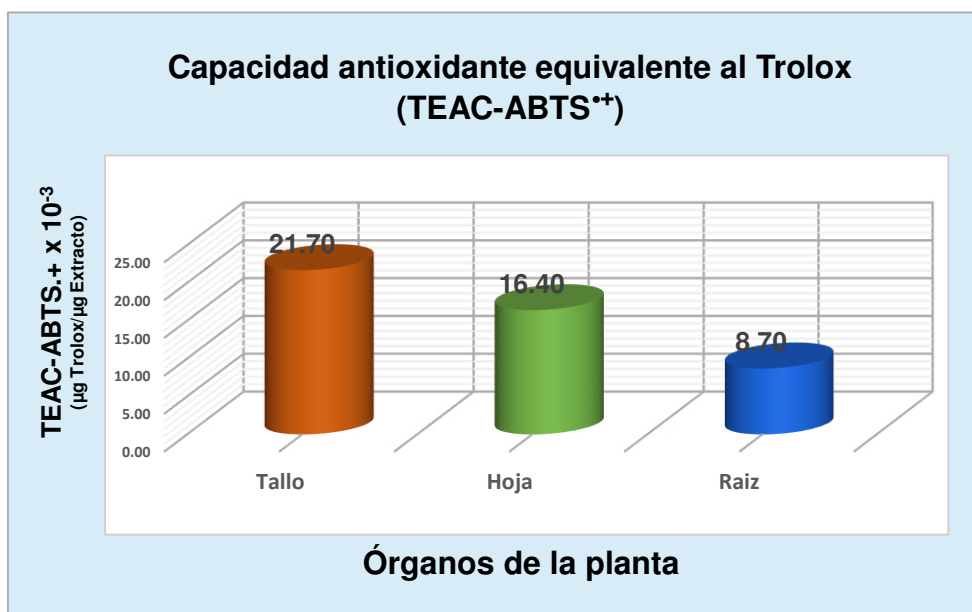


Figura 52. Comparativo de TEAC de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey por el **método ABTS⁺⁺**.

4.9. Actividad citotóxica: Bioensayo de citotoxicidad en *Artemia salina* (CYTED)

La Tabla 26 y Figura 53 muestran el número de nauplios de *Artemia salina* muertos para cada concentración de extracto hidroalcohólico de hojas de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey, donde se observa que a la mas alta concentración del extracto mayor número de nauplios de Artemia muertos.

Tabla 26. Registro de *Artemia salina* muertas a las 24 horas de exposición al extracto hidroalcohólico de **hojas de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey**

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Población total	N° Ensayos		
		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
0	10	0	0	0
500	10	3	2	4
550	10	5	6	4
600	10	7	6	7
650	10	8	8	7
700	10	9	9	10
750	10	10	10	10

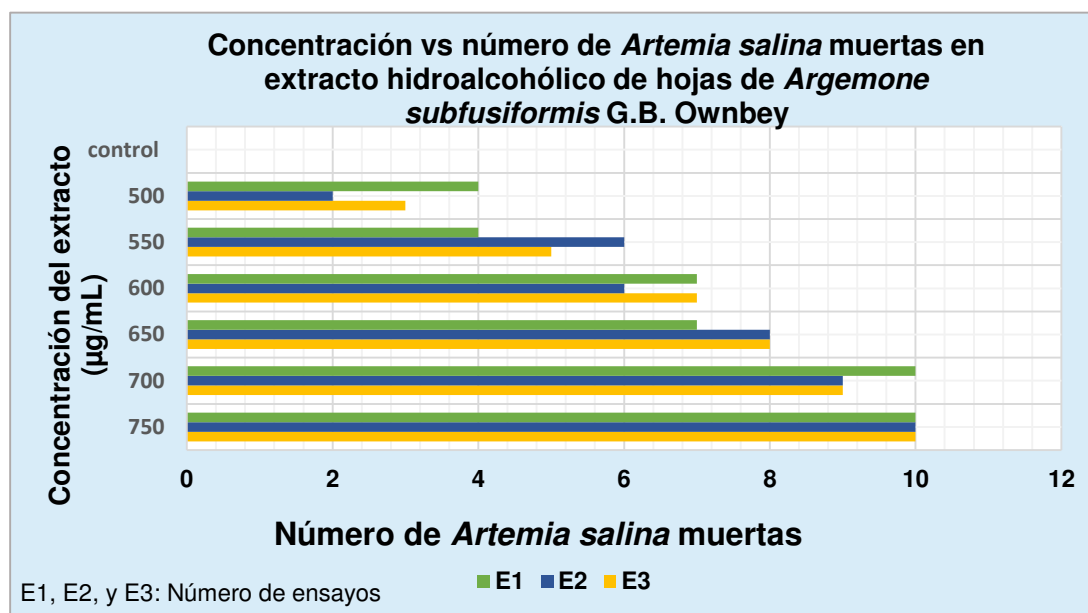


Figura 53. Comparativo de *Artemia salina* muertas en el extracto hidroalcohólico de hojas de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey.

El análisis de resultados del bioensayo de *Artemia salina* a las 24 horas se realizó con el modelo PROBIT programa estadístico SPSS versión 24. En la evaluación se determinó la CL₅₀ (Tabla 27) del extracto hidroalcohólico de hojas de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey, el cual fue de 552.868 µg/mL con una confiabilidad al 95% de 483.463 µg/mL y 591.14 µg/mL; resultados que de acuerdo a la escala del CYTED es ligeramente tóxico (Tabla 7).

Tabla 27. Concentración letal media (CL₅₀) sobre *Artemia salina* a las 24 horas de exposición al extracto hidroalcohólico de **hojas de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey** en el modelo PROBIT SPSS versión 24

Concentración (µg/mL)	Log ₁₀ (C)	Población Total	N° de <i>Artemia Salina</i> vivas	N° de <i>Artemia Salina</i> muertas	% de mortalidad	CL ₅₀ (µg/mL)
500	2.70	10	7	3	30	552.868
550	2.74	10	5	5	50	
600	2.78	10	3	7	70	
650	2.81	10	2	8	80	
700	2.85	10	1	9	90	
750	2.88	10	0	10	100	
Categoría:			Ligeramente tóxico			

La Tabla 28 y Figura 54 muestran el número de nauplios de *Artemia salina* muertas para cada concentración de extracto hidroalcohólico del tallo *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey, donde se observa que a la mas alta concentración del extracto mayor número de nauplios de Artemia muertos.

Tabla 28. Registro de *Artemia salina* muertas a las 24 horas de exposición al extracto hidroalcohólico de tallo de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Población total	N° Ensayos		
		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
0	10	0	0	0
500	10	4	3	5
550	10	4	5	3
600	10	5	8	6
650	10	8	7	7
700	10	9	7	8
750	10	10	9	9

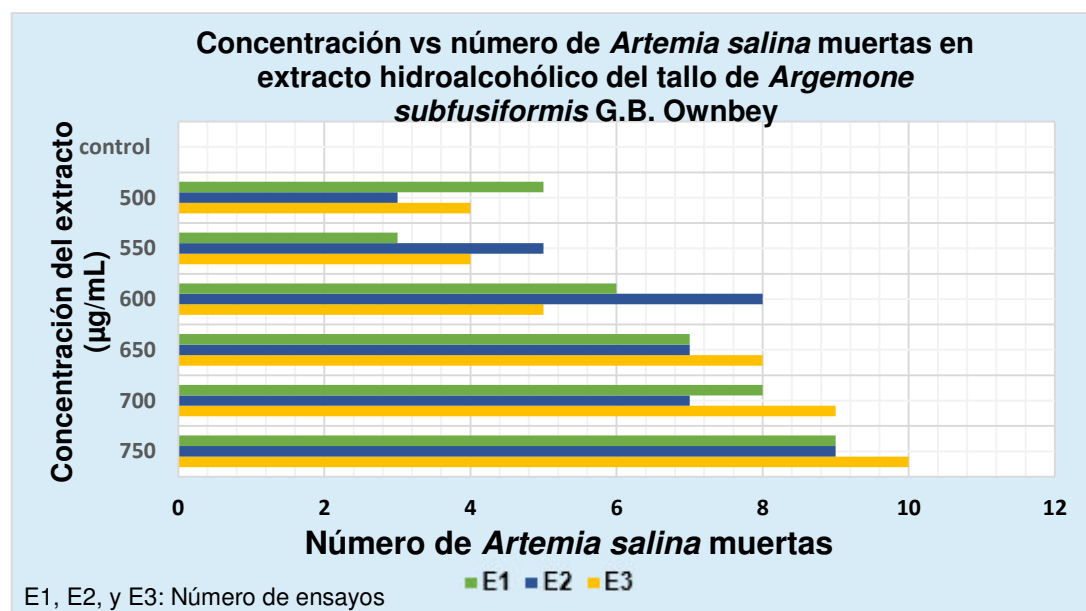


Figura 54. Comparativo de *Artemia salina* muertas en el extracto hidroalcohólico del tallo de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey.

El análisis de resultados del bioensayo de *Artemia salina* a las 24 horas se realizó con el modelo PROBIT programa estadístico SPSS versión 24. En la evaluación se determinó la CL₅₀ (Tabla 29) del extracto hidroalcohólico de tallos de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey, el cual fue de 562.790 µg/mL con una confiabilidad al 95% de 430.156 µg/mL y 617.034 µg/mL; resultados que de acuerdo a la escala del CYTED es ligeramente tóxico (Tabla 7).

Tabla 29. Concentración letal media (CL₅₀) sobre *Artemia salina* a las 24 horas de exposición al extracto hidroalcohólico de **tallo de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey** en el modelo PROBIT SPSS versión 24

Concentración (µg/mL)	Log ₁₀ (C)	Población Total	N° de <i>Artemia Salina</i> vivas	N° de <i>Artemia Salina</i> muertas	% de mortalidad	CL ₅₀ (µg/mL)
500	2.70	10	6	4	40	562.790
550	2.74	10	6	4	40	
600	2.78	10	4	6	60	
650	2.81	10	3	7	70	
700	2.85	10	2	8	80	
750	2.88	10	1	9	90	
Categoría:			Ligeramente tóxico			

La Tabla 30 y Figura 55 muestran el número de nauplios de *Artemia salina* muertas para cada concentración de extracto hidroalcohólico de la raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey, donde se observa que a la mas alta concentración del extracto mayor número de nauplios muertos.

Tabla 30. Registro de *Artemia salina* muertas a las 24 horas de exposición al extracto hidroalcohólico de raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Población total	N° Ensayos		
		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
0	10	0	0	0
500	10	4	2	3
550	10	3	2	5
600	10	5	5	4
650	10	8	8	9
700	10	8	9	10
750	10	9	10	10

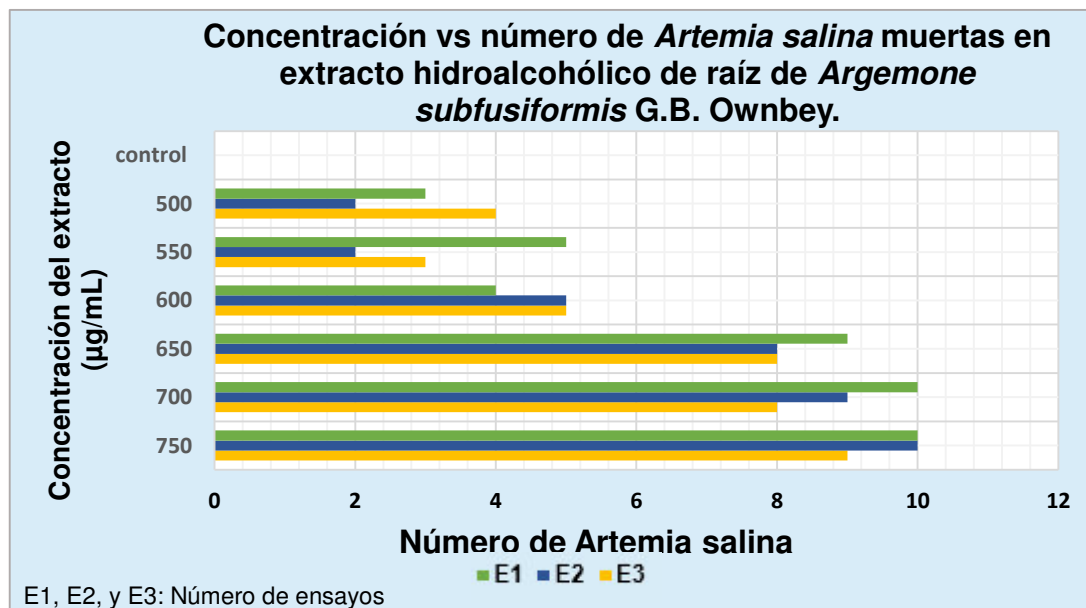


Figura 55. Comparativo de *Artemia salina* muertas en el extracto hidroalcohólico de la raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey.

El análisis de resultados del bioensayo de *Artemia salina* a las 24 horas se realizó con el modelo PROBIT programa estadístico SPSS versión 24. En la evaluación se determinó la CL₅₀ (Tabla 31) del extracto hidroalcohólico de raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey, el cual fue de 578.515 µg/mL con una confiabilidad al 95% de 531.341 µg/mL y 627.200 µg/mL; resultados que de acuerdo a la escala del CYTED es ligeramente tóxico (Tabla 7).

Tabla 31. Concentración letal media (CL₅₀) sobre *Artemia salina* a las 24 horas de exposición al extracto hidroalcohólico de **raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey** en el modelo PROBIT SPSS versión 24

Concentración (µg/mL)	Log ₁₀ (C)	Población Total	N° de Artemia Salina vivas	N° de Artemia Salina muertas	% de mortalidad	CL ₅₀ (µg/mL)
500	2.70	10	7	3	30	578.515
550	2.74	10	7	3	30	
600	2.78	10	5	5	50	
650	2.81	10	2	8	80	
700	2.85	10	1	9	90	
750	2.88	10	0	10	100	
Categoría:			Ligeramente tóxico			

En la Figura 56 se muestra un cuadro comparativo de las CL₅₀, donde se puede observar que a menor valor de CL₅₀ es mayor la actividad citotóxica; es decir, las hojas presentan mayor toxicidad en contraste con el tallo y raíz respectivamente.

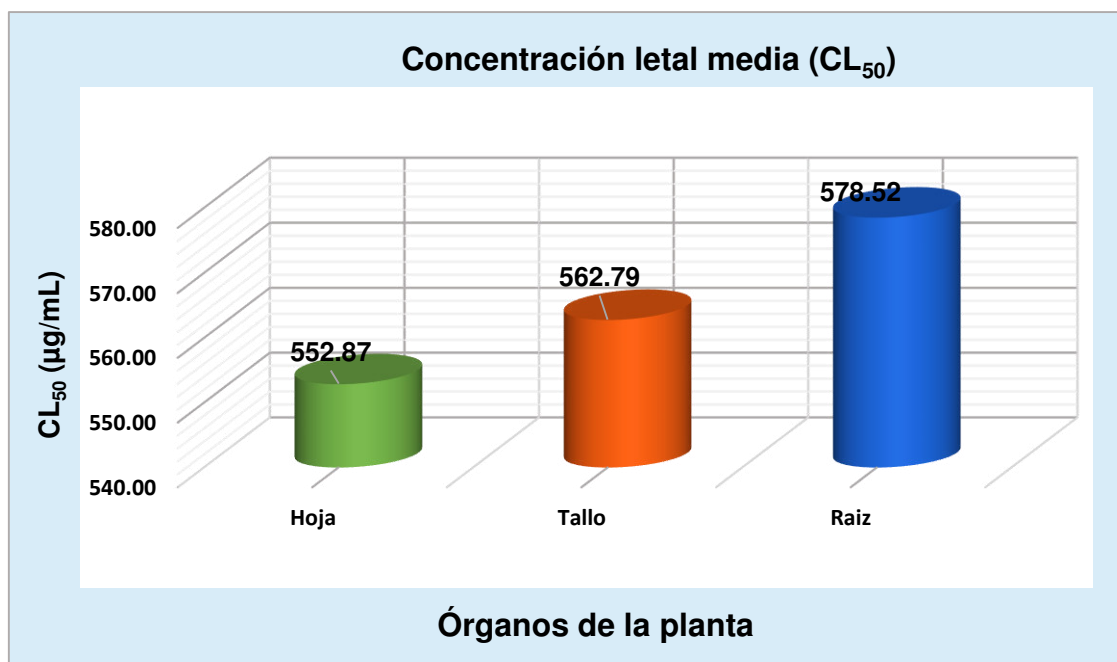


Figura 56. Comparativo de CL₅₀ de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey por el método del bioensayo de *Artemia salina*.

V. DISCUSIÓN

En la presente tesis se muestra una investigación comparativa sobre el estudio fitoquímico, actividades antioxidante y citotóxica de los extractos hidroalcohólicos obtenidos a partir de hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey. Los rendimientos de los extractos hidroalcohólicos de las hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey fueron 14.32%, 13.57% y 7.05% respectivamente (Tabla 8). No se encontraron literaturas en donde se obtenga el rendimiento de extractos hidroalcohólicos de la especie en estudio u otras especies de *Argemone*; sin embargo, se encontraron estudios de extractos con otros tipos de solventes como el de Jimoh et al. (2010), quienes obtuvieron unos rendimientos de 2.5%, 7.9% y 9.3% en acetona, metanol y agua respectivamente de las hojas de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey, es importante señalar que todos los extractos mencionados fueron obtenidos por extracción por maceración⁷⁷. La extracción por maceración con etanol es generalmente más eficaz para recuperar la mayoría de metabolitos secundarios, prácticamente en su totalidad sin alterarlos por efectos de temperatura, además este solvente tiene la capacidad de extraer compuestos de una amplia gama de polaridades, es menos tóxico y costoso que otros solventes orgánicos; sin embargo, se necesitan periodos mucho más extensos para lograr una extracción adecuada^{78, 79}.

Los resultados de la prueba de solubilidad (Tabla 9) muestran que los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey son solubles en compuestos polares y de mediana polaridad; siendo los extractos correspondientes a hojas y tallo muy solubles en agua, DMSO, metanol y solubles en etanol; para el extracto de la raíz este resulto ser muy soluble en metanol y soluble en agua, DMSO y etanol. Basados en esto y según Lock⁶⁶, posiblemente los componentes presentes serían compuestos fenólicos de tipo flavonoides y alcaloides.

De manera cualitativa, en el tamizaje fitoquímico de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey (Tabla 10), se evidenció la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, alcaloides, taninos y azúcares; dichos

resultados coinciden con lo reportado por Pérez et al. (2011), quienes en su investigación fitoquímica de los extractos etanólicos (etanol 96°) de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey en hojas y tallos donde se encontraron presencia de taninos y alcaloides; sin embargo, en el ensayo cualitativo no se observó presencia de flavonoides⁸⁰; en estudios anteriores en los extractos de agua, acetona y metanol en hojas de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey se cuantificaron compuestos fenólicos, flavonoides, flavonoles, proantocianidinas y alcaloides⁷⁷. Por otro lado, Sáenz (1964) en el tamizaje fitoquímico del extracto etanólico (etanol 95°) de *Argemone mexicana* L. se evidenció la presencia de alcaloides en hojas, tallo y raíz⁸¹; Sahu et al. (2012) obtuvieron extractos con solventes de diferentes polaridades en hojas de *Argemone mexicana* L. donde se reporta la presencia de flavonoides, alcaloides, taninos y saponinas para los extractos en metanol y acetona; evidenciándose solo la presencia de flavonoides, alcaloides y taninos en el extracto etanólico⁸²; mientras que Más et al. (2018) reportaron presencia de alcaloides, compuestos fenólicos, antocianinas y ausencia de flavonoides en el extracto etanólico (etanol 70°) de la raíz de *Argemone mexicana* L.⁸³; como se puede observar dichos resultados presentan coincidencia ya que ambas especies vegetales pertenecen al mismo género¹⁸.

En la cromatografía en capa fina analítica de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey empleándose FeCl₃ como revelador, se observó un color marrón verdoso lo que nos sugiere la presencia de un derivado de catecol; también se usó como revelador Dragendorff, observándose una coloración naranja lo que evidenció la presencia de alcaloides⁶⁶ (Figuras 27-29). La separación de colores es mucho más clara, pudiéndose apreciar tonalidades fluorescentes rojas, naranjas, celestes, verdes y otras. En función a los resultados obtenidos, la literatura atribuye la existencia de posibles flavanonas y flavonas sin 5-OH libre, flavonoles sin 5-OH libre y con 3-OH substituido, isoflavonas carentes de 5-OH libre serían los responsables de los tonos celestes y azul fluorescentes⁶⁶ (Figuras 25 y 30); también se observó fluorescencias de color naranja y verde lo que según la literatura revisada podría haberse detectado la presencia de berberina y sanguinarina alcaloides tipo de las plantas del género *Argemone*^{84,85,86} (Figuras 25-30).

Desafortunadamente no se pudieron identificar con certeza debido a que no se disponía de estándares, sin embargo, se logró realizar una primera aproximación en la identificación preliminar de algunos de estos metabolitos dado que existen datos reportados en la literatura para otras especies del género *Argemone* como la planta *Argemone mexicana*.

El contenido de compuestos fenólicos totales en *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey es un parámetro importante que establecería su potencial biológico, en especial para su actividad antioxidante. De los resultados obtenidos se puede observar que el tallo presenta un mayor contenido de compuestos fenólicos totales en comparación con las hojas y raíz (Tabla 13 y Figura 39); el contenido por el método Folin-Ciocalteu para el tallo, hojas y raíz reportaron 25.29 ± 0.07 mg EAG/g ES, 17.68 ± 0.10 mg EAG/g ES y 8.75 ± 0.02 mg EAG/g ES respectivamente, los resultados de este estudio parecen estar asociado al tipo de extracción en medio hidroalcohólico que favorecería la disolución y arrastre de los compuestos polifenólicos ya que según la literatura revisada el ensayo con FeCl_3 en extractos etanólicos permite reconocer la presencia tanto de fenoles como taninos⁷⁸, esto sería corroborado con el tamizaje fitoquímico donde resultó positivo a compuestos fenólicos en general, flavonoides y taninos; así como en las cromatografías en capa fina analítica (Figuras 27, 28 y 29) donde se observó tinción positiva para compuestos fenólicos. También, Jimoh et al. (2010) reportaron para las hojas de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey, los extractos de acetona (14.97 ± 0.46 mg EAT/g ES) y metanol (14.0 ± 0.89 mg EAT/g ES) mostraron mayores concentraciones de compuestos fenólicos totales que el extracto acuoso (6.18 ± 0.27 mg EAT/g ES), la determinación se dio mediante el método de Folin-Ciocalteu y los extractos se obtuvieron por maceración durante un período de 18-24 horas a temperatura ambiente, se concentraron a presión reducida por debajo de 40°C y el extracto acuoso se liofilizó⁷⁷. Otros investigadores, realizaron estudios en extractos de hojas de *Argemone mexicana* L. y por el método de Folin-Ciocalteu, como el reportado por Sarker et al. (2012), quienes mencionaron que el extracto de acetato de etilo (106.65 ± 1.39 mg EAG/g ES) mostró mayor concentración de compuestos fenólicos que los extractos con metanol (70.19 ± 2.10 mg EAG/g ES) y n-hexano (35.59 ± 1.49 mg

EAG/g ES), los extractos se obtuvieron por maceración durante un período de 72 horas a temperatura ambiente y se concentraron con un evaporador rotativo a baja temperatura (40-50°C) y presión reducida⁸⁷; también Rajalakshmi et al. (2016) reportaron para las hojas de *Argemone mexicana* L., los extractos en etanol (480±1.04 mg EAG/100g ES) y acetato de etilo (445±0.07 mg EAG/100g ES) mostraron mayor concentración de polifenoles que el extracto acuoso (364±0.13 mg EAG/100g ES), los extractos se obtuvieron por maceración durante un período de 48 horas a temperatura ambiente⁸⁸. Como podemos observar las diferencias en la cuantificación de compuestos fenólicos pueden depender de diferentes factores como el método de extracción y capacidad de extracción del solvente empleados, la preparación del material a extraer, la temperatura y el tiempo de extracción⁸⁹; incluso del tipo de especie empleada en el estudio y características edafológicas y climatológicas donde se recolectó las especies.

Los flavonoides son compuestos fenólicos que se encuentran presentes en todos los órganos de la planta, siendo los más comunes las flavonas y flavonoles y más limitadas en su ocurrencia, las isoflavonas, las chalconas y auronas⁶⁶. Como características generales de estos compuestos se debe mencionar su solubilidad en agua y etanol, su carácter fenólico y su intensa absorción en la región ultravioleta y visible del espectro⁷⁸. Durante nuestra investigación se ha comprobado tanto cualitativamente como cuantitativamente que las muestras analizadas de los extractos hidroalcohólico de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey contienen compuestos fenólicos y flavonoides, reportándose un mayor contenido de flavonoides totales en hojas (708.33±6.76 µg EQ/g ES) en comparación con la cantidad encontrada en tallos (191.98±6.17 µg EQ/g ES) y raíz (54.17±3.87 µg EQ/g ES), esto podría deberse a que los flavonoides abundan en las partes aéreas jóvenes y más expuestas al sol, como hojas, frutos y flores, ya que la luz solar favorece su síntesis³³. Se observa que el contenido de flavonoides de cada una de las muestras analizadas es menor en comparación con el contenido de compuestos fenólicos totales que se presentan en las Figuras 39 y 40, esto se debe a que los compuestos fenólicos engloban a los flavonoides. En otro estudio realizado por Jimoh et al. (2010) se encontraron contenido

de flavonoides en las hojas de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey en los extractos de acetona (1.22 ± 0.03 mg EQ/g ES), metanol (0.35 ± 0.12 mg EQ/g ES) y acuoso (0.63 ± 0.01 mg EQ/g ES)⁷⁷. También se reportó el contenido de flavonoides para las hojas de *Argemone mexicana* L., los extractos de etanol (184 ± 0.04 mg EQ/100g ES) y acuoso (181 ± 0.05 mg EQ/100g ES) mostraron resultados muy similares en comparación a lo obtenido en el extracto en acetato de etilo (165 ± 0.05 mg EQ/100g ES)⁸⁸; estos últimos resultados coinciden con lo hallado en nuestra investigación en cuanto a proporción ya que se puede observar la ventaja de los extractos etanólicos y acuoso para extraer flavonoides. Por otro lado, Nabel et al. (1987) en sus estudios comparativos de flavonoides en algunas especies de la familia Papaveraceae (no incluye a *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey, pero sí a *Argemone mexicana* L.) nos señala la distribución de flavonoides de tipo flavonol como kaempferol, quercetina y gossypetin; es importante mencionar esta información ya que dichos estudios fueron realizados en extractos etanólicos (etanol 70°) de hojas y tallos⁹⁰. Seguidamente se procedió con la lectura en el espectro UV-Visible y de acuerdo a lo publicado por Mabry et al. (1970)⁶⁷ se propone de los extractos hidroalcohólicos de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey las estructuras químicas que corresponden a las hojas 3',4'-dihidroxi-7metoxiflavona y 3',4'-dihidroxi-5',5,7-trimetoxiflavona (Figuras 31 y 32); tallo 3',4',5,7,8-pentahidroxiflavona y 3',4',7 trihidroxiflavona (Figuras 33 y 34); raíz 7-hidroxi-4'-metoxiflavona, 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona y 3',5-dihidroxi-4',3,7-trimetoxiflavona (Figuras 35, 36 y 37). Al analizar el espectro UV-Visible de los extractos se puede apreciar que dichas estructuras corresponden al grupo de las flavonas que presentan tres cromóforos: etileno, carbonilo y benceno; los mismos que son responsables de la absorción de la energía procedente de la interacción de las radiaciones electromagnéticas, además el enlace doble del anillo C favorece la conjugación entre el anillo B y el grupo carbonilo de la posición C₄ (Figura 11) hace que estos flavonoides muestren espectros de absorción UV-Visible fuerte por encima de los 200 nm^{31,91}.

En la evaluación de la actividad antioxidante se tuvo en cuenta lo señalado en la Tabla 6, donde se presenta una clasificación que nos indica que a menor valor de IC₅₀ mayor potencial antioxidante; para los extractos hidroalcohólicos en las hojas, tallo y raíz de

Argemone subfusiformis G.B. Ownbey mediante el método DPPH se reportaron valores de IC₅₀ de 497.52±1.21, 330.48±1.09 y 1017.83±3.11 µg/mL respectivamente y por el método ABTS^{•+} se reportaron los IC₅₀ de 181.27±0.84, 136.70±0.24 y 341.60±0.95 µg/mL respectivamente; de acuerdo al criterio antes mencionado se determina que los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey presentan bajo potencial antioxidante por ambos métodos. Adicionalmente para la evaluación de la actividad antioxidante se empleó el TEAC que mide la capacidad antioxidante de una sustancia dada, en comparación con el estándar de Trolox; para los extractos hidroalcohólicos en las hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey mediante el método DPPH se reportaron valores de 6.6x10⁻³±0.02, 9.9x10⁻³±0.03 y 3.2x10⁻³±0.01 microgramos equivalentes de Trolox por microgramo de extracto seco respectivamente; por el método ABTS^{•+} se reportaron los valores de 16.4x10⁻³±0.01, 21.7x10⁻³±0.01 y 8.7x10⁻³±0.02 microgramos equivalentes de Trolox por microgramo de extracto seco respectivamente; de lo mencionado se concluye que el tallo tiene mayor actividad antioxidante con respecto a las hojas y raíz. Los resultados muestran que para todos los extractos en estudio, los valores de ABTS^{•+} expresados como TEAC son mayores que en la técnica con DPPH, debido a la baja selectividad del ABTS^{•+}, que reacciona con cualquier compuesto aromático hidroxilado, independientemente de su potencial antioxidante real⁹².

La mayor actividad captadora de los radicales DPPH y ABTS^{•+} se registró en el extracto hidroalcohólico del tallo seguido de las hojas y raíz respectivamente; adicionalmente, se puede apreciar una relación con los compuestos fenólicos cuyos contenidos están en el mismo orden (aquí también se incluye a los flavonoides a pesar de que exhibieron un orden distinto en su contenido). Otras investigadores⁷⁷ mencionaron las capacidades de inhibición de radicales DPPH del extracto de las hojas de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey en metanol (92.3%) ligeramente menos que las del ácido ascórbico (99%) y BHT (99.3%), mientras que para los extractos en acetona y agua reportaron un 84,9% y 69.5% respectivamente; para el ABTS^{•+} todos los extractos en acetona (98.2%), metanol (99.4%), agua (95.5%) y BHT (99.3%) produjeron una actividad de eliminación de radicales ABTS^{•+} similar o igual. También se encontró

información del porcentaje de inhibición de DPPH en extractos de hojas de *Argemone mexicana* L. expresados como IC₅₀ para los extractos en n-hexano (245.25±3.19 µg/mL), acetato de etilo (152.15±2.43 µg/mL) y metanol (201.20±2.60 µg/mL)⁸⁷ lo que indicaría según la tabla 6 que dicha especie también tendría bajo potencial antioxidante. Según la literatura revisada, existen evidencias que *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey presenta cierta actividad antioxidante; por lo que en el presente estudio su actividad puede atribuirse a la presencia de compuestos fenólicos de tipo flavonoide y tanino que se encontraron en el tamizaje fitoquímico, cromatografía, espectroscopía UV-Visible, contenido de compuestos fenólicos y flavonoides totales, también podría contribuir el alcaloide berberina ya que en estudios como Meza C. (2008) reportó su importante actividad antioxidante, donde menciona porcentajes de inhibición del radical DPPH para la especie vegetal *Berberis rotundifolia* (extracción por maceración con metanol por 72 horas de las partes aéreas y raíz de la fracción donde se identificó berberina) de 30.06±0.45 (0 min), 50.66±0.57 (5 min), 53.21±0.67 (10 min), 54.99±0.62 (15 min) y 59.12±0.67(30 min); observándose que se produjo un discreto incremento en la inhibición hasta el termino del ensayo⁹³.

Se demostró que los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey presentan ligera actividad citotóxica, esta se determinó mediante el bioensayo de citotoxicidad en *Artemia salina* donde los resultados de la CL₅₀ fueron 552.868 µg/mL, 562.790 µg/mL y 578.515 µg/mL respectivamente; resultados similares fueron reportados por Bussmann et al. (2011), quienes realizaron un estudio sobre la toxicidad de plantas medicinales utilizadas en medicina tradicional en el norte de Perú, entre las especies estudiadas se encuentra *Argemone mexicana* L. los resultados para el extracto etanólico (etanol 96°) en la prueba de bioensayo de citotoxicidad fue 698 µg/mL⁹⁴, como podemos observar los resultados de ambos estudios son similares, esto se puede deber a que ambas especies pertenecen a la mismo género¹⁸. En este estudio se obtuvo CL₅₀ 552.868 µg/mL para el extracto hidroalcohólico de hojas, que resultó mayor al obtenido por Sarker et al. (2012) quienes determinaron que las CL₅₀ de los extractos de n-hexano, etil acetato y metanol de hojas

de *Argemone mexicana* L. fueron de 245.25 µg/mL, 152.15 µg/mL y 201.20 µg/mL respectivamente⁸⁷. Mahour et al. (2011) también demostraron por ensayo de *Artemia salina* que la CL₅₀ del extracto metanólico de hojas de *Argemone mexicana* L. por método Soxhlet fue 118.23 µg/mL y por el método de reflujo 192.69 µg/mL⁹⁵. Bapna et al. (2015) determinaron por el ensayo de *Artemia salina* que la CL₅₀ del extracto de alcaloide de las hojas de *Argemone mexicana* L. fue 226.65 µg/mL y la CL₅₀ del extracto de la fracción de berberina extraída de las hojas *Argemone mexicana* L. fue de 178.85 µg/mL⁹⁶. Por otro lado, se obtuvo CL₅₀ 578.515 µg/mL para el extracto hidroalcohólico de raíz este valor es bastante mayor al reportado por Nahar et al. (2014) quienes indicaron por el ensayo de *Artemia salina* una CL₅₀ del extracto de diclorometano de raíz de *Argemone mexicana* L. fue 22.35 µg/mL⁹⁷. En relación al extracto del tallo la CL₅₀ fue de 562.790 µg/mL, este resultado es mayor al obtenido por Reyes et al (2011) quienes demostraron que la actividad citotóxica del extracto metanólico de *Argemone ochroleuca* Sweet (Chicalote) es altamente tóxico con una CL₅₀ de 10 g/mL⁹⁸. Las diferencias en los resultados podrían también deberse a las características del suelo, distribución geográfica y climatológica donde se recolectó las especies, los solventes, medios de extracción y diferencias entre las especies, por ejemplo, su composición química⁹⁹.

La actividad citotóxica de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de *Argemona subfusiformis* G.B. Ownbey puede atribuirse a la presencia de alcaloides, que pudieron ser observados en el análisis fitoquímico preliminar. Vidal et al (2009) en su estudio efecto tóxico de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey y *Tagetes patula* Link sobre larvas del IV estadio y pupas de *Aedes aegypti* L. hace referencia a que la mortalidad ocasionada por *Argemona subfusiformis* G.B. Ownbey se debería a los alcaloides presentes en la planta¹⁰⁰. Además, según literatura revisada se menciona que la toxicidad de *Argemone mexicana* L. es debido a la presencia de alcaloides como sanguinarina y berberina¹⁰¹; asimismo, es importante señalar que los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de *Argemona subfusiformis* G.B. Ownbey presentaron resultados positivos para la capacidad antioxidante y citotóxica, estas propiedades pueden ser atribuidas a la presencia de compuestos fenólicos de tipo flavonoide y alcaloide respectivamente; queda abierta la posibilidad de realizar

pruebas adicionales utilizando otros organismos y diferentes tipos de solventes para extraer y evaluar la composición química que garantice el uso terapéutico.

VI. CONCLUSIONES

1. La cuantificación de compuestos fenólicos totales para hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey “Cardo santo” fue de 17.68 ± 0.10 , 25.29 ± 0.07 y 8.75 ± 0.02 mg EAG/g del extracto seco respectivamente; el extracto hidroalcohólico de tallo presento mayor contenido de compuestos fenólicos totales.
2. La cuantificación de flavonoides totales para hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey “Cardo santo” fue: 708.33 ± 6.76 , 191.98 ± 6.14 y 54.17 ± 3.87 $\mu\text{g EQ/g}$ de extracto seco respectivamente; el extracto hidroalcohólico de hojas presentó mayor cantidad de flavonoides totales. Por espectroscopía UV-Visible se proponen 2 estructuras de flavonoides para hojas, 2 estructuras de flavonoides para tallo y 3 estructuras de flavonoides para raíz.
3. Los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey “Cardo santo”, evaluados por el método DPPH presentaron actividad antioxidante con un IC_{50} de 497.52 ± 1.21 , 330.48 ± 1.09 y 1017.83 ± 3.11 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente; asimismo, expresaron un TEAC-DPPH de $6.6 \times 10^{-3} \pm 0.02$, $9.9 \times 10^{-3} \pm 0.03$ y $3.2 \times 10^{-3} \pm 0.01$ $\mu\text{g ET}/\mu\text{g}$ de extracto seco; por el método ABTS^{•+} presentaron un IC_{50} de 181.27 ± 0.84 , 136.70 ± 0.24 y 341.60 ± 0.95 $\mu\text{g/mL}$ y un TEAC-ABTS^{•+} de $16.4 \times 10^{-3} \pm 0.01$, $21.7 \times 10^{-3} \pm 0.01$ y $8.7 \times 10^{-3} \pm 0.02$ $\mu\text{g ET}/\mu\text{g}$ de extracto seco; correspondiendo la mayor capacidad antioxidante al extracto hidroalcohólico proveniente del tallo por ambos métodos.
4. Los extractos hidroalcohólicos de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey evaluados por el método del bioensayo de *Artemia salina* mostraron: CL_{50} de 552.868 $\mu\text{g/mL}$, 562.790 $\mu\text{g/mL}$ y 578.515 $\mu\text{g/mL}$ para hojas, tallo y raíz respectivamente, lo que indicó ligera actividad citotóxica en los tres órganos.

VII. RECOMENDACIONES

- Continuar con el estudio fitoquímico, antioxidante y citotóxico de la especie *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey, dada por la presencia de numerosos metabolitos en su composición química y fuente promisorio en la búsqueda de biomoléculas con actividades biológicas y potenciar el conocimiento sobre esta especie.
- Se recomienda el uso de estándares para la identificación y cuantificación de alcaloides presentes en *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey, con el fin de realizar mayores estudios a los extractos y contribuir en la búsqueda de nuevas alternativas biológicas para elaborar plaguicidas naturales.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gallegos-Zurita M. Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *An Fac med.* 2016; 77(4): 327-32.
2. Quevedo R. La Medicina Tradicional en el Sistema Oficial de Salud en el Perú. 2009. [Consultado 21 mayo 2019]. Disponible en: http://www.academia.edu/435259/Medicina_Tradicional_en_el_Sistema_de_Salud_en_el_Peru.
3. Pérez F, León G, Rodríguez F, Vásquez L. Estudio fotoquímico preliminar de plantas medicinales del norte del Perú. *Pueblo cont.* 2011; 22(2): 421-426.
4. Calderón J. Caracterización fitoquímica, actividad antibacteriana y antioxidante de extractos de plantas medicinales utilizadas en Pereira y Santa Rosa de Cabal (Risalda). [Tesis]. Colombia: Escuela de Tecnología Química; 2011.
5. Doroteo V, Díaz C, Terry C, Rojas R. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante *in vitro* de 6 plantas peruanas. *Rev Soc Quím Perú.* 2013; 79 (1): 13-20.
6. Arias M. Caracterización físico-químico y sensorial de nabiza y grelo (*Brassica rapa* L.). [Tesis doctoral]. España: Universidad Santiago de Compostela, 2010.
7. Castañeda B, Ibáñez L, Ramos E. Evaluación de la actividad citotóxica *in vitro* de cinco plantas medicinales peruanas (Abuta, Ajo sachá, Moena, Murure y Tahuari). *Cultura.* 2008; 22: 141-168.
8. Martínez M, Ocampo D, Galvis J, Valencia A. Actividad antibacteriana y citotoxicidad *in vivo* de extractos etanólicos de *Bauhinia variegata* L. (Fabaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales.* 2011; 16(4): 313-323.
9. Alva R, Zavaleta D. Cuantificación de flavonoides totales de las hojas y flores de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey (Cardo santo), proveniente del Centro Poblado El Trópico, Distrito de Huanchaco, Provincia de Trujillo, Región La Libertad-2015. [Tesis]. Perú: Universidad Nacional de Trujillo; 2015.

10. Cuellar N, Lujan C, Cosa M. *Argemone subfusiformis* (Papaveraceae) especie nativa de interés etnomédico: su anatomía y aplicación en el control de calidad. *Arnaldoa*. 2013; 20 (1): 69-82.
11. Calderón G. Papaveraceae. Flora Bajío reg. adyac. 1991. [Consultado 01 febrero 2019]; 1:1-35. Disponible en: <http://inecolbajio.inecol.mx/floradelbajio/documentos/fasciculos/ordinarios/Papaveraceae%201.pdf>
12. Papaveraceae juss. Laboratorio de Sistemática de Plantas vasculares, Facultad de Ciencias Universidad de la República de Uruguay: 2017 [Consultado 01 febrero 2019]. Disponible en: http://www.thecompositaehut.com/www_tch/webcurso_spv/familias_pv/papaveraceae.html
13. Naczi R. Papaveraceae, the Pop y Family. Bull. New York Bot. Gard. 2016. [Consultado 01 Febrero 2019]: 1-13. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.21135/893275471.024>
14. Diego N, Bustamante R. Flora de Guerrero. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias, 2017. [Consultado 01 febrero 2019]. Disponible en: <http://biologia.fciencias.unam.mx/plantasvasculares/PDF%20FLORAS/078%20Papaveraceae-Primulaceae.pdf>
15. Castroviejo S. Laves de Flora ibérica. Vol. I. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Pteridophyta, Gymnospermae, Angiospermae (Lauraceae-Euphorbiaceae). Madrid. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. 2001. [Consultado 18 febrero 2019]. Disponible en: http://www.floraiberica.es/floraiberica/texto/pdfs/01_038_03_Argemone.pdf.
16. Ownbey G. The Genus *Argemone* in South America and Hawai. *Brittonia*. 1961; 13: 91-109.
17. Schwarzbach A, Kadereit J. Phylogeny of prickly poppies, *Argemone* (Papaveraceae), and the evolution of morphological and alkaloid characters based on ITS nrDNA sequence variation. *Plant Syst. Evol.* 1999; 218: 257-279.

18. Peña R. El género *Argemone* (Papaveraceae). Revista Chloris Chilensis (Santiago de Chile) 2002; 5 (2). [Consultado 18 febrero 2019]. Disponible en: <http://www.chlorischile.cl>
19. Adanson M. Familia de Plantas Parte II. Paris: Partie; 1763. [Consultado 27 marzo 2019]. Disponible en <http://www.floraargentina.edu.ar/wpcontent/uploads/2019/01/PAPAVERACEAE-FUMARIACEAE.pdf>
20. Lamien-Meda A, König K, Mischka M, Meda R, Compaoré M, Kiendrebeogo M et al. *Argemone mexicana*. [Monografía en Internet]. Austria; 2014. [Consultado 27 marzo 2019]. Disponible en https://www.vetmeduni.ac.at/fileadmin/v/antimalarial-plants/bf/Monograph_Argemone_mexicana.pdf
21. Manske, R. The Alkaloids: Chemistry and Physiology. Academic Press, 1975 [Consultado 06 de abril de 2019]. Disponible en: <https://books.google.com.pe/books?id=6N6Ut58oYL0C&pg=PA266&lpg=PA266&dq=composicion+quimica++argemone+subfusiformis&source=bl&ots=XyiyAMRFv0&sig=ACfU3U1bPgITwR5bccZEIJX66Fb2OQIQA&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjNsPvTi7rhAhVLtlkKHXL6Csg4ChDoATAEegQICRAB#v=onepage&q=composicion%20quimica%20%20argemone%20subfusiformis&f=false>
22. Juri M, Montero L, Gimelfarb S, Ormeño M, Prosperi A, Chiarini F. Usos de plantas medicinales y aromáticas silvestres. Chilecito - Famatina. Chilecito: MAGyP, U.N. de Chilecito. 2012.
23. Vermerris W, Nicholson R. Phenolic Compound Biochemistry. Springer Science & Business Media. 2009. [Consultado 10 abril 2019]. Disponible en: <https://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=uLzdV8fsRxC&oi=fnd&pg=PR10&dq=phenolics+compounds+definition&ots=1hJHXLQQIC&sig=wfvXbug3YcLxTvNdE0jHTDB88Ec#v=onepage&q=phenolics%20compounds%20definition&f=false>
24. Hernández A. Tratado de nutrición / Nutrition Treatise: Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos / Composition and Nutritional Quality of Foods. Madrid: Ed. Médica Panamericana, 2010. [Consultado 11 abril 2019]. Disponible

en:https://books.google.com.pe/books?id=hcwBJ0FNvqYC&pg=PT426&dq=Hern%C3%A1ndez+A.+Tratado+de+nutricion+compuestos+fenolicos&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiZwauWo4_kAhXJ1FkKHQSnACsQ6AEILTAB#v=onepage&q=Hern%C3%A1ndez%20A.%20Tratado%20de%20nutricion%20compuestos%20fenolicos&f=false

25. Valencia E, Figueroa I, Sosa E, Bartolome M, Martínez H, García M. Polyphenols: antioxidant and toxicological properties. *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas*. 2017; 16: 15-29.
26. Altamirano J. Caracterización fitoquímica y evaluación del contenido de provitamina A y vitamina C en diez líneas promisorias de oca (*Oxalis tuberosa Mol*) y zanahoria blanca (*Arracacia xanthorrhiza Bancroft*). [Tesis Doctoral]. Ecuador: Facultad de ciencias Químicas, Universidad del Ecuador; 1997. [Consultado 13 abril 2019]. Disponible en: https://books.google.com.pe/books?id=EIEzAQAAMAAJ&pg=PP22&lpg=PP22&dq=Caracterizaci%C3%B3n%20fitoqu%C3%ADmica%20y%20evaluaci%C3%B3n%20del%20contenido%20de%20provitamina%20A&source=bl&ots=G_988j1Slz&sig=ACfU3U3tLYB51wnjxVBfm3aTU5svgRT3RQ&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwj4q_WbhY7kAhWBmVvKkHZgwBCMQ6AEwAXoECAkQAQ&fbclid=IwAR2V_IVzUDIFRmtozG5wCXyt9-G7OoU6ZA1veAGXnp3we5s4salmDcvm9G4#v=onepage&q=Caracterizaci%C3%B3n%20fitoqu%C3%ADmica%20y%20evaluaci%C3%B3n%20del%20contenido%20de%20provitamina%20A&f=false
27. Goleniowski M, Bonfill M, Cusido R, Palazón J. Phenolic Acids. Natural Products. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013. [Consultado 15 abril 2019]. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/278701249>
28. Robbins R. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *J. Agric. Food Chem*. 2003; 51 (10): 2866-2887.
29. Panche A, Diwan A, Chandra S. Flavonoids: an overview. *JNS* 2016; 5 (47): 1-15.
30. Cartaya O, Reynaldo I. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*. 2001; 22 (2): 5-14.

31. Martínez S, González J, Culebras J, Tuñón M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* 2002; 17 (6): 271-278.
32. Kumar K, Pandey M. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal.* 2013; 1-16.
33. López T. Flavonoides. *Offarm.* 2002; 21(4): 108-113.
34. Gómez M. Metabolismo de flavonoides y ácidos hidroxycinámicos de la dieta. Estudios de transporte *in vitro* y de disponibilidad en humanos. [Tesis Doctoral]. Madrid: Departamento de Nutrición y Bromatología I, Universidad Complutense de Madrid, 2015.
35. Pérez G. Los Flavonoides: Antioxidantes o Prooxidantes. *Rev. Cubana Invest Biomed.* 2003; 22(1): 48-57.
36. Escamilla C, Cuevas E, Guevara J. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev Fac Med UNAM.* 2009; 52 (2): 73-75.
37. Banjarnahor S, Angelina M, Artanti N. Antioxidant properties of flavonoids. *Med J Indones.* 2014; 23(4): 239-244.
38. Prochazkova D, Bousova I, Wilhelmova N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia.* 2011; 82: 513-523.
39. Vicente-Vicente L, Prieto M, Morales A. Eficacia y seguridad de la quercetina como complemento alimenticio. *Rev. Toxicol.* 2013; 30: 171-181.
40. Cruz J. Difusión de Rutina y sus productos de descomposición en una película de ácido poliláctico (PLA) hacia simulantes de alimentos. [Tesis Magister]. México: Centro de investigación en alimentación y desarrollo, A.C.; 2011.
41. Viada E, Gómez L, Campaña I. Estrés oxidativo. *Correo científico médico de Holguín.* 2017; (1): 171-186.
42. Venereo J. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit.* 2002; 31(2): 126-133.
43. Finkel T, Holbrook N. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 2000; 408: 239-247.
44. Pham-Huy L, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci.* 2008; 4 (2): 89-96.

45. Corrales L, Muñoz M. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*. 2012; 10(18): 135 - 250.
46. Maldonado O, Jiménez E, Bernabé M, Ceballos G, Méndez E. Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Rev Med UV*. 2010; 33-39.
47. Velázquez M, Prieto B, Contreras R. El envejecimiento y los radicales libres. *Ciencias*. 2004; 75: 36-43.
48. Sánchez M. Antioxidantes: consumo de antioxidantes naturales en adultos mayores de entre 65 y 75 años con Dislipidemia. [Tesis]. Argentina: Universidad Abierta Interamericana; 2013.
49. Zamora J. Antioxidantes: micronutrientes en la lucha por la salud. *Revista chilena de nutrición*. 2007. [Consultado 29 de mayo 2019]; 34(1). Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071775182007000100002.
50. Ighodaro O, Akinloye O. First line defense antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): their fundamental role in the entire antioxidant defense grid. *Alexandria Journal of Medicine*. 2018; 54: 287-293.
51. Londoño J. Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. *Desarrollo y Transversalidad* 5 ed. Medellín, Colombia: Corporación Universitaria Lasallista; 2012: 129-162. Disponible en: <http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/133/3/9.%20129162.pdf>.
52. Avello M, Suwalsky M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*. 2006; 2(494): 161-172.
53. Birben E, Murat U, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *WAO Journal*. 2012; 5(1): 9 -19.
54. Mironczuk-Chodakowska I, Witkowska A, Zujko M. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Advances in Medical Sciences*. 2018; 63: 68-78.

55. Arencibia D, Rosario L, Curveco D. Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *Rev Toxicol.* 2003; 40-52.
56. Castro S. Evaluación de la actividad citotóxica de extractos y fracciones de *Iseria laevis* empleando líneas celulares derivada de tumores humanos. [Tesis]. Bogotá: Facultad de Biología, Pontificia Universidad Javeriana; 2006.
57. Pérez O, Jorge F. Ensayo de Artemia: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Rev. Protección Veg.* 2010; 22(1): 34-43.
58. Salgado I. La Artemia y su cultivo en el Perú. [Monografía en Internet]. Piura: 2001. [Consultado 17 de mayo de 2019]. Disponible en: <http://portal.unap.cl/~cordunap/archivos/amunoz/Nutrici%F3n%20y%20Enfermedades/La%20Artemia%20y%20su%20Cultivo.pdf>
59. Emslie S. Artemia salina. Animal Diversity Web. 2003. [Consultado 19 mayo del 2019]. Disponible en: https://animaldiversity.org/accounts/Artemia_salina/
60. Hernández E, Maya A. Desarrollo embrionario de *Artemia salina* (Linnaeus 1758) en condiciones artificiales. [Monografía en Internet]. Mexico: 2012. [Consultado 17 mayo del 2019]. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/95247974/Desarrollo-Larval-de-Artemia-Salina-Sp>
61. Gomez C, Ramirez E. Determinación de la concentración letal media (CL50-48) del herbicida Roundup 747 sobre ecosistemas acuáticos mediante pruebas toxicológicas con *Daphnia magna*. [Tesis]. Bogotá DC: Universidad de la Salle; 2008.
62. Sánchez L, Neira A. Bioensayo general de letalidad en *Artemia salina*, a las fracciones del extracto etanólico de *Psidium guajava*. L y *Psidium guineense*. Sw. *Cultura Científica.* 2005; 40-45.
63. González A, Presa M, Latorre M, Lurá M. Detección de metabolitos fúngicos con actividad tóxica mediante bioensayo sobre Artemia salina. *Rev Iberoam Micol.* 2007; 24: 59-61.
64. Fernández-Calienes A, Mendiola J, Monzote L, García M, Sariego I, Acuña D, et al. Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible

- acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. Rev. Cubana Med Trop. 2009; 61(3): 254-258.
65. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la investigación. 5a. ed. México DF: McGraw-Hill; 2010.
66. Lock O. Investigación fitoquímica "Métodos en el estudio de productos naturales". 2a. ed. Lima: Fondo Editorial PUCP; 1994.
67. Mabry T, Markham K, Thomas M. The systematic identification of flavonoids. New York-Heidelberg-Berlín: Springer-Verlag; 1970.
68. Valenzuela P. Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de fenoles totales y flavonoides de hojas de diferentes genotipos de *ugni molinae turcz.* [Tesis]. Santiago, Universidad de Chile; 2015.
69. Cabral de Oliveira A, Barros Valentim I, Oliveira Fonseca M. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. Revista Química Nova (São Paulo) 2009; 32 (3): 689-702.
70. Fernández R. Extracción de compuestos fenólicos de la macroalga marina *Lessonia trabeculata*, determinación de su actividad antioxidante y evaluación citotóxica. [Tesis]. Arequipa, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa; 2017.
71. Amaya L, Portillo C. Determinación de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante en melaza, azúcar blanco y moreno en el Ingenio Chaparrastique por el método de espectrofotometría ultravioleta-visible. [Tesis]. San Salvador, Universidad de El Salvador; 2013.
72. Tovar Del Río J. Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecorregión cafetera. [Tesis]. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira; 2013.
73. Cárdenas C, Actividad antimicrobiana y antioxidante del extracto etanólico de *Prosopis pallida* "algarrobo". [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2017.
74. Aguado M, Nuñez M, Bela A, Okulik N, Bregni C. Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de un extracto etanólico de *Aloysia polystachya*

- (Griseb.) Mold. (Verbenaceae). Revista mexicana de Ciencias Farmacéuticas (Chaco) 2013; 44 (3): 46-51.
75. Martínez-Hormaza I, Quintero-Rodríguez G, Márquez-Montiel L, González-Lavaut J, Álvarez-Reyes A, Zarragoitia A. Determinación de la citotoxicidad de extractos de *Erythroxylum confusum* Britt. mediante el método de la *Artemia salina*. Acta Farm. Bonaerense (Buenos Aires) 2006; 25 (3): 429-431.
 76. Pinzón R, Sánchez C. Manual de Técnicas de Investigación: CYTED. Subprograma X. Química fina farmacéutica 1995; 45-47.
 77. Jimoh F, Adedapo A, Aliero A, Afolayan A. Polyphenolic and biological activities of leaves extracts of *Argemone subfusiformis* (Papaveraceae) and *Urtica urens* (Urticaceae). Revista de Biología Tropical (San José) 2010; 58 (4): 1517-1531.
 78. Sierra M, Barros R, Gómez D, Mejía A, Suarez D. Productos Naturales: Metabólicos Secundarios y Aceites Esenciales. 1a. ed. Bogotá: Fundación Universitaria Agraria de Colombia; 2018.
 79. Velásquez, D. Evaluación de la actividad antimicrobiana, antioxidante y citotoxicidad de los extractos etanólico y acuoso de *Tagetes multiflora* kunth "chinche". [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2017.
 80. Pérez F, León G, Ávalos F, Vásquez L. Estudio fitoquímico preliminar de plantas medicinales del norte del Perú. Revista Pueblo Continente (Trujillo) 2011; 22 (2): 421-426.
 81. Sáenz J. Contribución al estudio fitoquímico de plantas costarricenses I. Análisis Alcaloidal. Revista de Biología Tropical (Costa Rica) 1964; 12 (1): 67-74.
 82. Sahu M, Debata N, Padhy R. Antibacterial activity of *Argemone mexicana* L. against multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*, isolated from clinical samples. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine (Nueva Delhi) 2012; 2 (2): 800-807.
 83. Más D, Martínez Y, Bullaín M, Betancur C, Ruiz C. Secondary metabolites and *in vitro* antimicrobial activity of roots of cuban *Argemone mexicana* Linn. World Journal of Pharmaceutical and Medical Research. 2018; 4(6): 46-51.

84. Carrillo M. Regulación de la síntesis de alcaloides en cultivos *in vitro* de *Argemone mexicana*. [Maestría]. México: Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.; 2006.
85. Serrano J. Establecimiento de cultivos *in vitro* de *Argemone mexicana* L. para el estudio de la biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos. [Maestría]. México: Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.; 2015.
86. Vergara M. Análisis de la redundancia genética en la ruta de síntesis alcaloides bencilisoquinolínicos en *Argemone mexicana* L. [Maestría]. México: Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.; 2016.
87. Sarker A, Hasan A, Ara F, Hossan S, Matin M. Phytochemical analysis and bioactivities of *Argemone mexicana* Linn. Leaves. Pharmacologyonline Newsletter. 2012; 3: 16-23.
88. Rajalakshmi P, Pugalenth M, Vadivel V. *In vitro* and inhibitory activity of pathogens on leaves of *Argemone mexicana* L. and *Premna tomentosa* L. International Journal of Herbal Medicine. 2016; 4(5): 84-90.
89. Bucic-Kojic A, Planinic M, Tomas S, Jokic S, Mujic I, Bilic M, Belic D. Effect of extraction conditions on the extractability of phenolic compounds from lyophilized fig fruits (*Ficus Carica* L.). Pol. J. Food Nutr Sci. 2011; 61(3): 195-199.
90. Nabel A, Saleh, Salwa A, Maksoud M, El-Hadidi, Wafaa M. A Comparative Study of Flavonoids in some Members of the Papaveraceae. Biochemical Systematics and Ecology. 1987; 15(6): 673-675.
91. Cuesta O, Márquez I, Campo M. Introducción a la Caracterización Estructural de Flavonoides. 1a. ed. Quito: Universidad Técnica de Machala; 2015.
92. Palomino L, Garcia C, Gil J, Rojano B, Durango D. Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. 2009; 16(3): 388-395.
93. Meza K. Química y actividad biológica de *Berberis rotundifolia*. [Tesis]. Chile: Universidad Austral de Chile. 2008.

94. Bussmann R. Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. *J Ethnopharmacol.* 2011; 137(1): 121–140.
95. Mahour K, Kumar A, Vihan V. Effect on physicochemical characters and bioactivity of *Argemone mexicana* in different plant extraction methods. *J. Adv. Lab. Res. Biol.* 2011; 2(4): 167-169.
96. Bapna S, Choudhary P, Ramaiya M, Chowdhary A. Antiplasmodial activity of *Argemone mexicana*: an *in vivo* and *in vitro* study. *World Journal of Pharmaceutical Research.* 2015; 4(11): 1653-1663.
97. Nahar A, Habib M, Awal M, Rahman A, Mondol M, Alam M. Studies on antifungal activity and brine shrimp toxicity *Argemone Mexicana*. *KYAMC Journal.* 2014; 4(2): 402-405.
98. Reyes F, Peña C, Canales M, Jimenez M, Meraz S, Hernandez T. Antimicrobial activity of *Argemone ochroleuca* Sweet (Chicalote). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.* 2011; 10 (2):139-146.
99. Fernández-Calienes A, Mendiola J, Scull R, Morier L, Linares L, Mendoza D, Cuéllar A. Anti-plasmodial activity of *Parthenium hysterophorus* L. lactones and *Argemone mexicana* L. alkaloids in Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical.* 2016; 68(2): 136-147.
100. Vidal J, Carbajal A, Sisniegas M, Bobadilla M. Efecto tóxico de *Argemone subfusiformis* Owb y *Tagetes patula* Link sobre larvas del IV estadio y pupas de *Aedes aegypti* L. *Rev. Perú. biol.* 2009; 15(2): 103-109.
101. Laines J. Análisis de la síntesis de alcaloides en fruto y semilla de *Argemone mexicana* L. [Tesis de Magister]. México: Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. 2019.

IX. ANEXOS

Anexo N°1: Constancia de clasificación taxonómica



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año de la Buena atención al Ciudadano"

CONSTANCIA N° 032-USM-2017

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (rama fértil), recibida de CASTILLO LABORIO Edith y CIEZA HEREDIA María del Rosario, alumnas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; ha sido estudiada y clasificada como: *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1981):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: MAGNOLIIDAE

ORDEN: PAPAVERALES

FAMILIA: PAPAVERACEAE

GENERO: *Argemone*

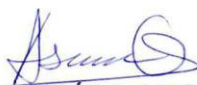
ESPECIE: *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey

Nombre vulgar: "Cardo santo".

Determinado por: Mg. María I. La Torre

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Lima, 6 de marzo de 2017


Mag. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRÍA
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)



Anexo N°2: Estabilización, selección, secado y preparación de los extractos hidroalcohólicos de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey

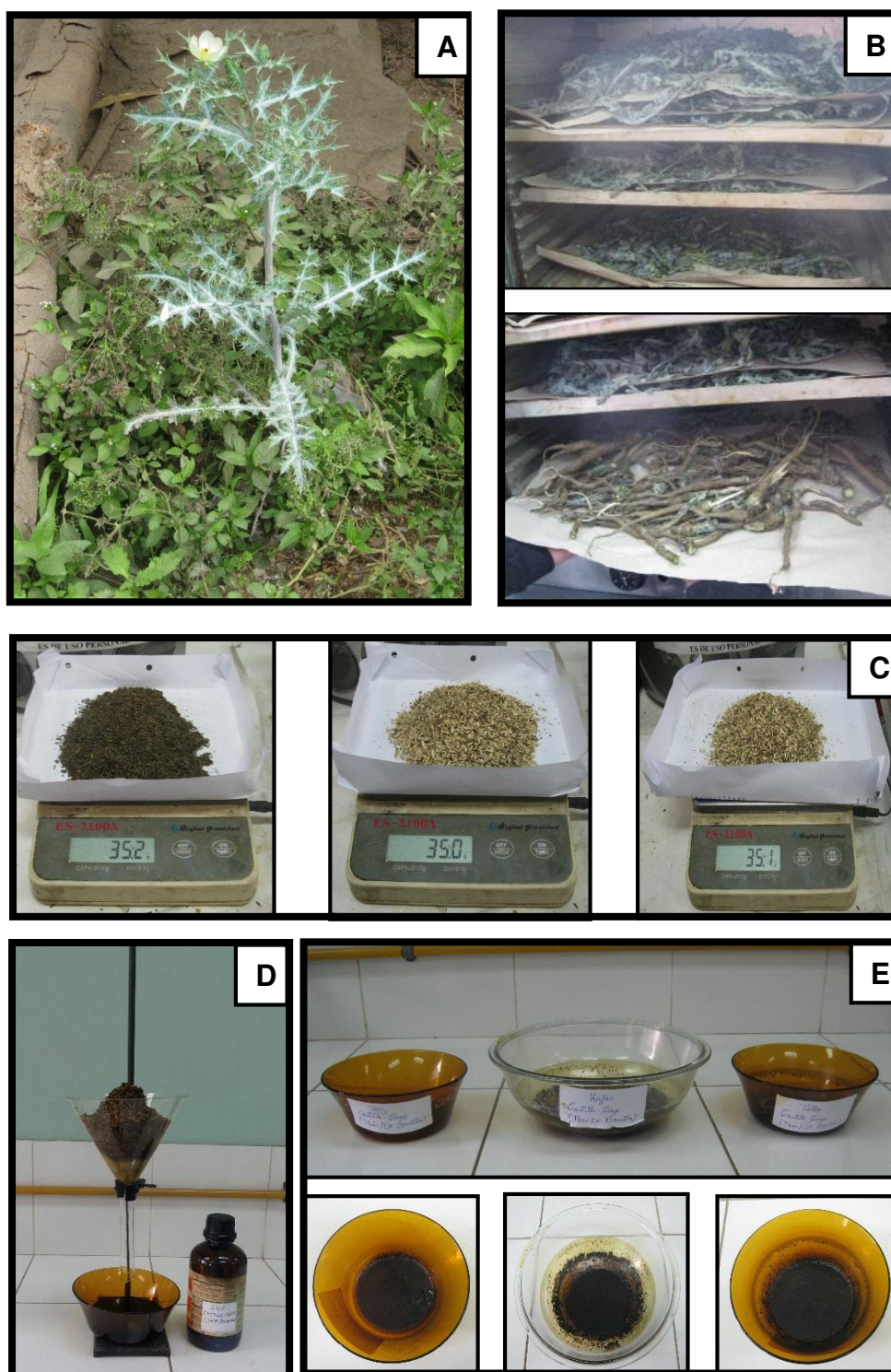


Figura 1. Proceso de obtención de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz. **(A)** Especie *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey; **(B)** Muestras vegetales en proceso de secado en estufa; **(C)** Muestras vegetales molidas (de izquierda a derecha: hojas, tallo y raíz); **(D)** Filtrado del extracto hidroalcohólico; **(E)** Extracto hidroalcohólico seco (de izquierda a derecha: raíz, hojas y tallo).

Anexo N°3: Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de **hojas** de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey

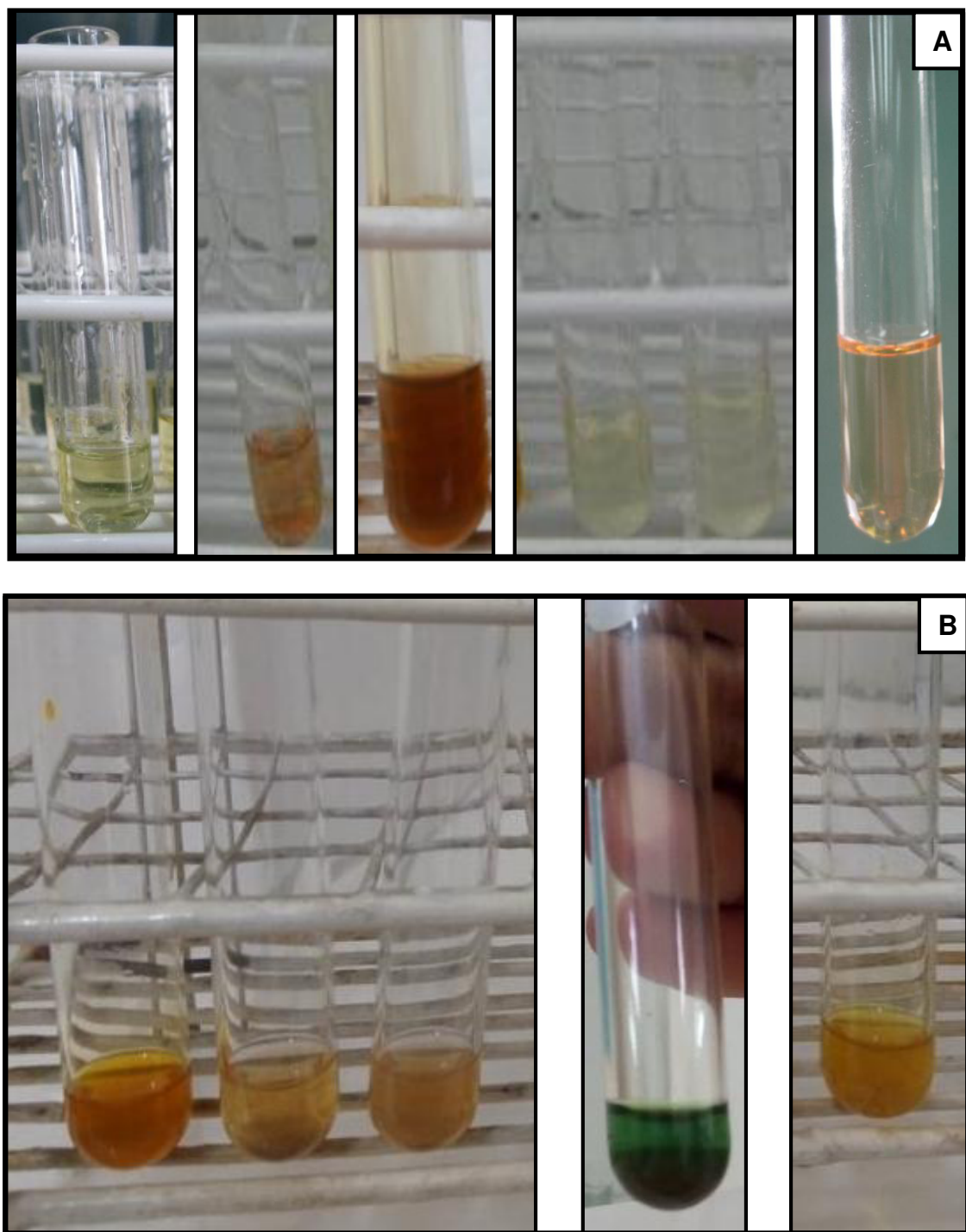


Figura 2. Tamizaje fitoquímico de las hojas. **(A)** De izquierda a derecha: Blanco, identificación con los reactivos de Molish, Cloruro de hierro, gelatina, Nihidrina, Shinoda, **(B)** De izquierda a derecha: identificación con los reactivos de Dragendorff, Mayer, Bertrand, Sonnenschein y Popoff.

Anexo N°4: Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de tallo de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey

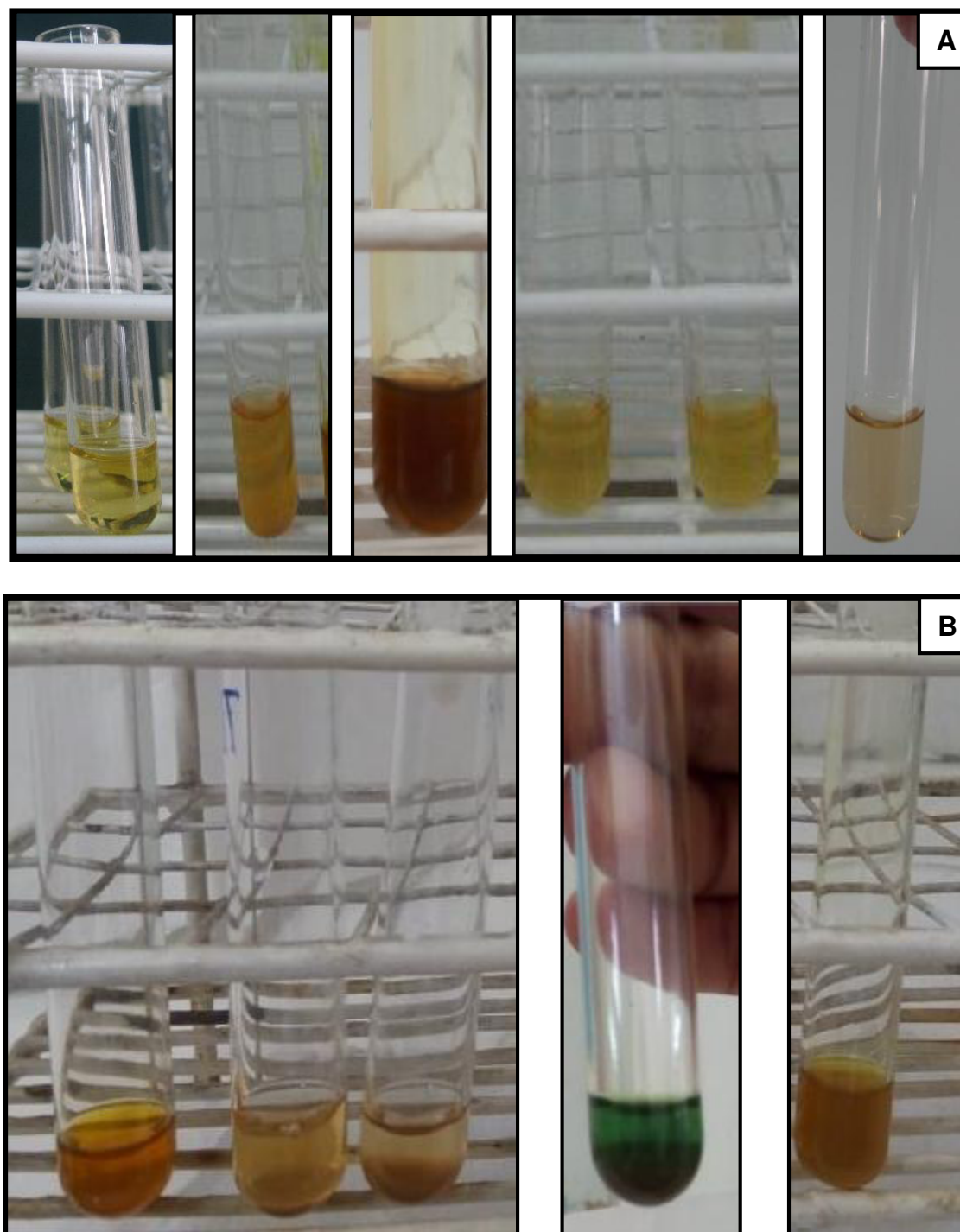


Figura 3. Tamizaje fitoquímico del tallo. **(A)** De izquierda a derecha: Blanco, identificación con los reactivos de Molish, Cloruro de hierro, gelatina, Nihidrina, Shinoda, **(B)** De izquierda a derecha: identificación con los reactivos de Dragendorff, Mayer, Bertrand, Sonnenschein y Popoff.

Anexo N°5: Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey

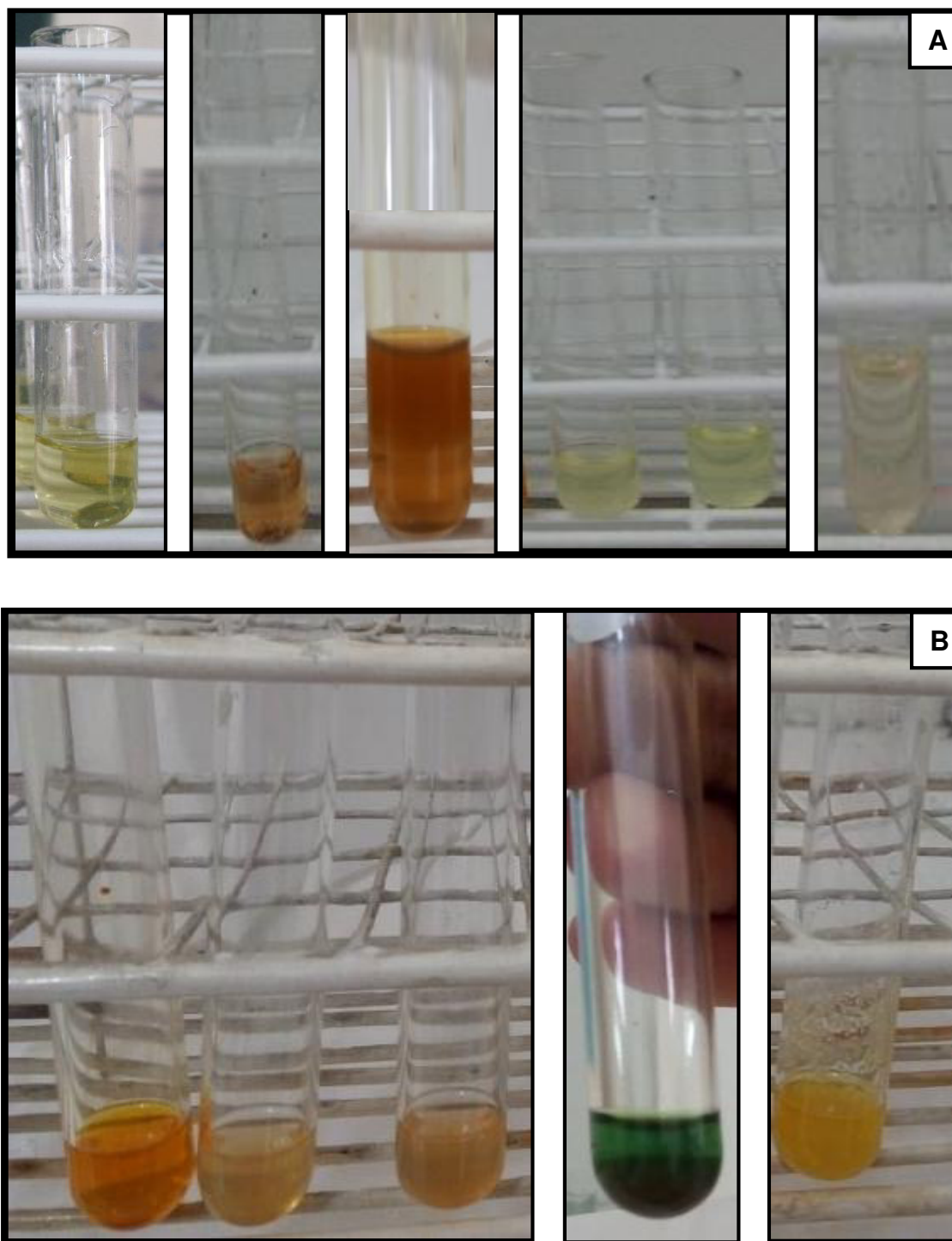


Figura 4. Tamizaje fitoquímico de la raíz. **(A)** De izquierda a derecha: Blanco, identificación con los reactivos de Molish, Cloruro de hierro, gelatina, Nihidrina, Shinoda, **(B)** De izquierda a derecha: identificación con los reactivos de Dragendorff, Mayer, Bertrand, Sonnenschein y Popoff.

Anexo N°6: Cromatografías de los extractos hidroalcohólicos de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey

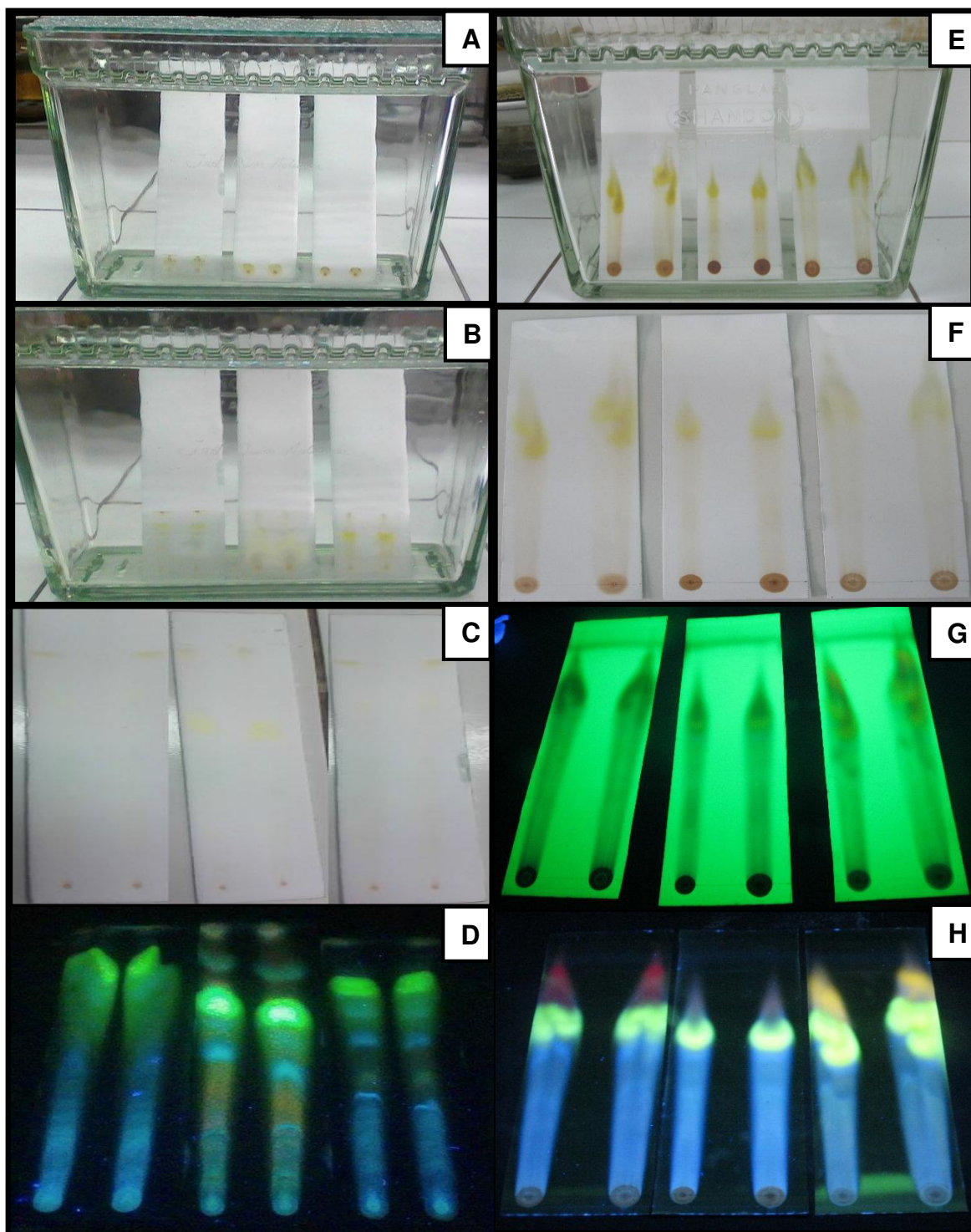


Figura 5. Cromatografías. (A) Origen o punto de inicio; (B) Separación de los componentes en la fase estacionaria; (C) Cromatografía-luz visible; (D) Cromatografía-luz UV 365 nm; (E) y (F) A medida que la fase móvil se desplaza, se va separando los componentes de las muestras en la fase estacionaria; (G) y (H) Cromatografía-luz UV 254 y 365nm respectivamente.

(A), (B), (C) y (D) Fase móvil cloroformo: metanol (30:10)/muestras de izquierda a derecha: tallo, raíz y hojas.

(E), (F), (G) y (H) Fase móvil acetato de etilo: etanol (30:10)/ muestras de izquierda a derecha: hojas, tallo y raíz.

Anexo N°7: Determinación de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales de los extractos hidroalcohólicos de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey

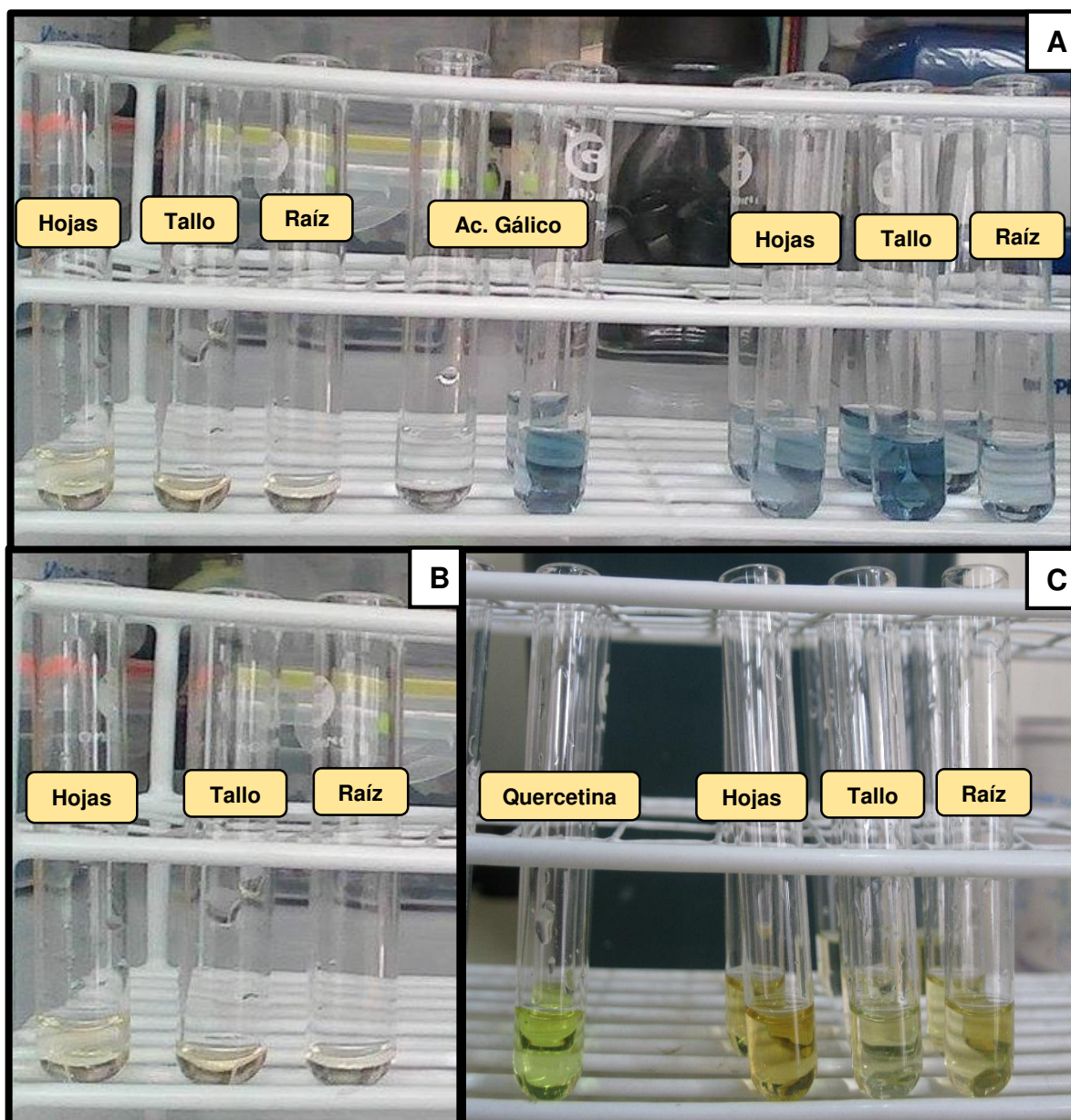


Figura 6. Compuestos fenólicos y flavonoides. **(A)** Cuantificación de compuestos fenólicos totales (de izquierda a derecha: blancos de los extractos hidroalcohólicos de las muestras vegetales, ácido gálico antes y después de haber sido agregado el reactivo Folin-Ciocalteu, extractos hidroalcohólicos de las muestras vegetales después de haber sido agregado el reactivo Folin-Ciocalteu; **(B)** Extractos hidroalcohólicos de las muestras vegetales; **(C)** Cuantificación de flavonoides totales (de izquierda a derecha: Patrón de quercetina, extractos hidroalcohólicos de las muestras vegetales después de haber sido agregado tricloruro de aluminio ($AlCl_3$)).

Anexo N°8: Actividad antioxidante por los métodos **DPPH** y **ABTS^{•+}** de los extractos hidroalcohólico de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey

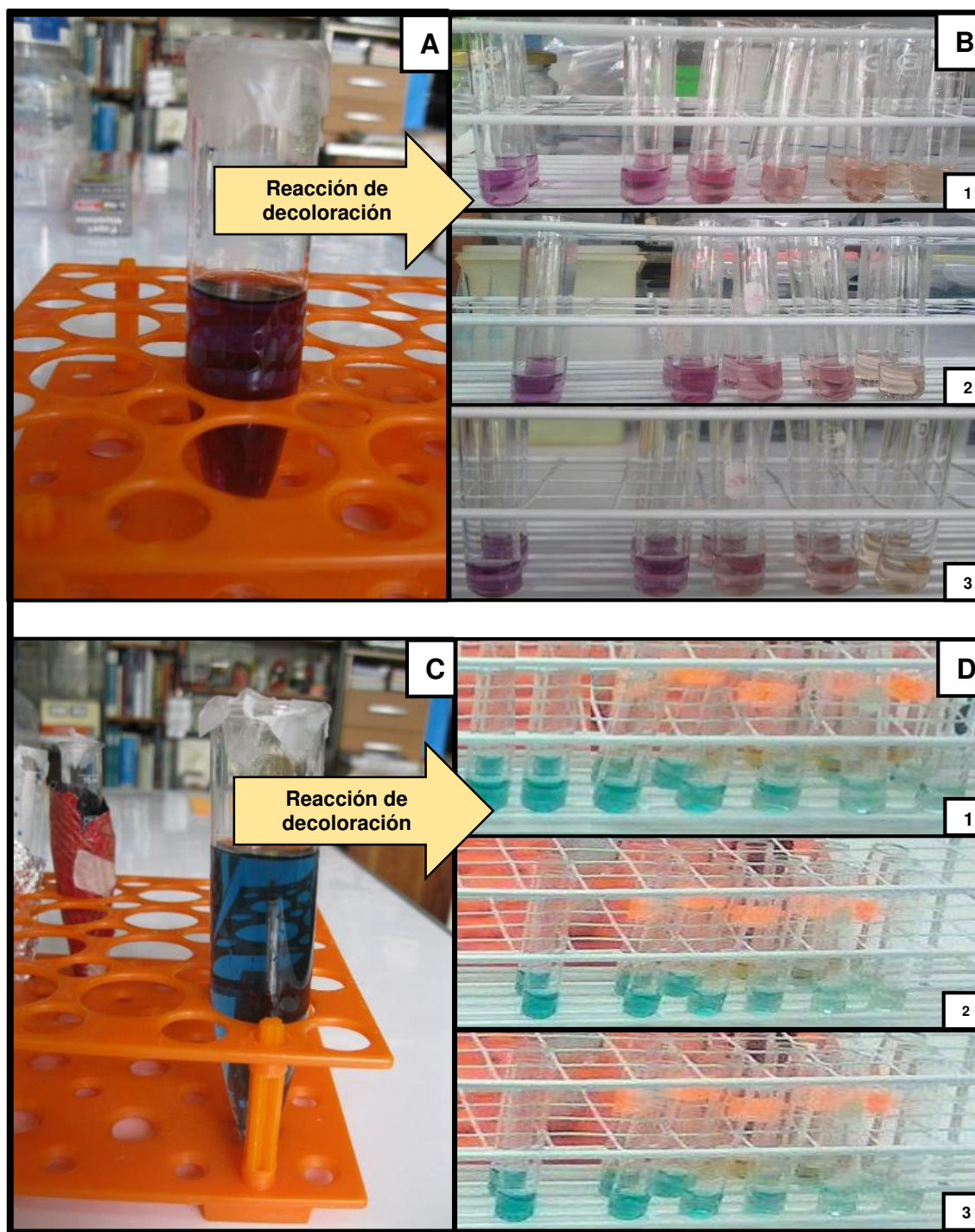


Figura 7. Actividad antioxidante. **(A)** Reactivo DPPH; **(B)** Concentraciones finales para las **(B.1)** Hojas-DPPH (0, 120, 240, 360, 480 y 600 µg/mL), **(B.2)** Tallo-DPPH (0, 100, 200, 300 y 400 µg/mL), **(B.3)** Raíz-DPPH, (0, 300, 600, 900 y 1200 µg/mL); **(C)** Reactivo ABTS; **(D)** Concentraciones finales para las **(D.1)** Hojas-ABTS (0, 40, 80, 120, 160, 200 y 240 µg/mL mL), **(D.2)** Tallo-ABTS (0, 30, 60, 90, 120 y 150 µg/mL), **(D.3)** Raíz-ABTS, (0, 100, 200, 300, 400 y 500 µg/mL)

Anexo N°9: Preparación del agua de mar artificial usada en la eclosión y cultivo de los quistes de *Artemia salina*



Figura 8. Medio artificial. **(A)** Filtración del agua de mar artificial; **(B)** Equipo de laboratorio HACH; **(C)** Medición de las condiciones del agua empleadas en el ensayo de *Artemia salina* (conductividad, pH y salinidad); **(D)** Agua de mar artificial colocada en la cámara de incubación para recibir a los quistes de *Artemia salina*.

Anexo N°10: Eclosión de quistes de *Artemia salina* y preparación de las concentraciones de los extractos hidroalcohólicos de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey



Figura 9. Eclosión y cultivo de *Artemia Salina*. (A) Bomba de oxígeno; (B) Quistes de *Artemia salina*; (C) y (D) Eclosión de los quistes de *Artemia salina* después de 48 horas de incubados los quistes.

Anexo N°11: Eclosión, cultivo y bioensayo en *Artemia Salina*

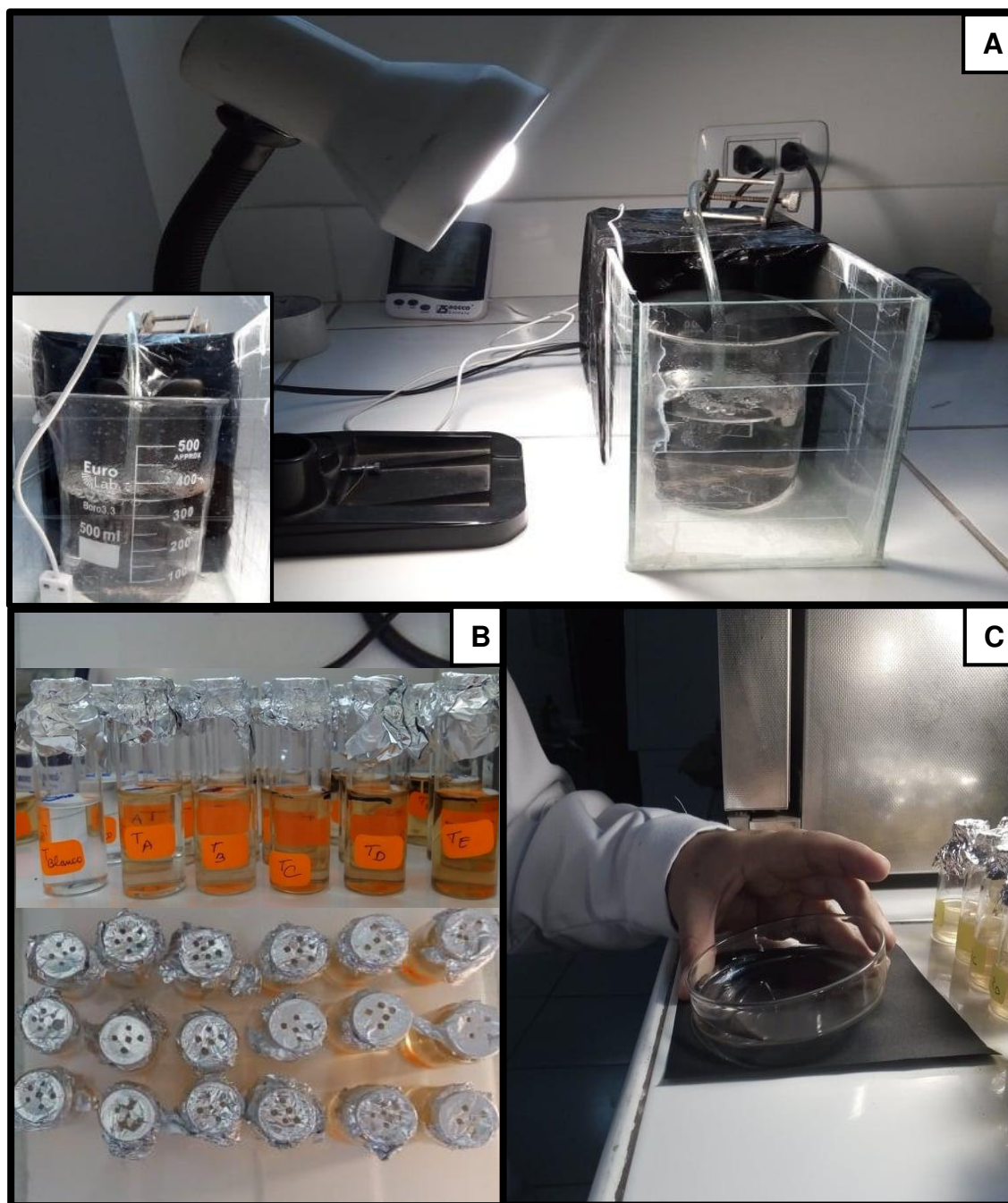
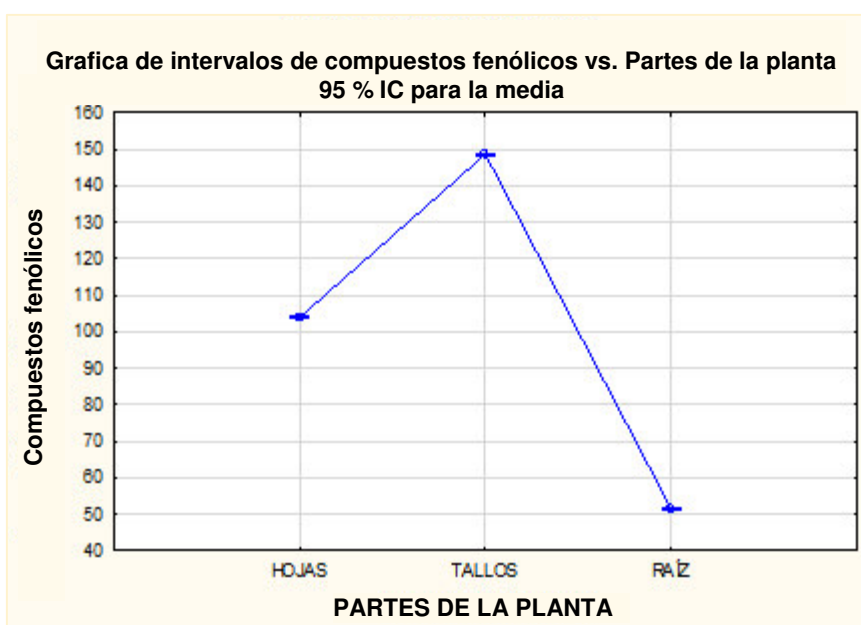


Figura 10. Dispositivo empleado en la eclosión y cultivo de quistes de *Artemia Salina*. **(A)** Diseño completo del dispositivo para la eclosión y cultivo de los quistes de *Artemia salina*, en la parte posterior y anterior se puede observar la zona oscura y la zona iluminada (lámpara doméstica) respectivamente; **(B)** Diferentes concentraciones de los extractos hidroalcohólicos, obsérvese las perforaciones en la parte superior de los viales que permiten el suministro de oxígeno; **(C)** Conteo del número de nauplios muertos y sobrevivientes de *Artemia salina* sometidos a las diferentes concentraciones de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey.

Anexo N°12: Análisis estadístico ANOVA y prueba de Tukey del contenido de compuestos fenólicos de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey

Tabla de Análisis de Varianza (ANOVA)					
Effect	Degr. of Freedom gl	Univariate Results for Each DV (Spreadsheet1) Over-parameterized model Type III decomposition			
		Concentración de Ac. Gálico/g de Extracto seco (μmol/g) SS	Concentración de Ac. Gálico/g de Extracto seco (μmol/g) MS	Concentración de Ac. Gálico/g de Extracto seco (μmol/g) F	Concentración de Ac. Gálico/g de Extracto seco (μmol/g) p
Intercept	1	92435.80	92435.80	526204.6	0.000000
PARTES DE LA PLANTA	2	14198.11	7099.06	40412.4	0.000000
Error	6	1.05	0.18		
Total	8	14199.17			

gl: grados de libertad, SS: Suma de cuadrados, MS: Cuadrado medio, F: estadístico de prueba, p: valor de probabilidad ($p < 0.05$ significancia estadística, $p > 0.05$ no hay significancia estadística).



La desviación estándar agrupada se utilizó para calcular los intervalos

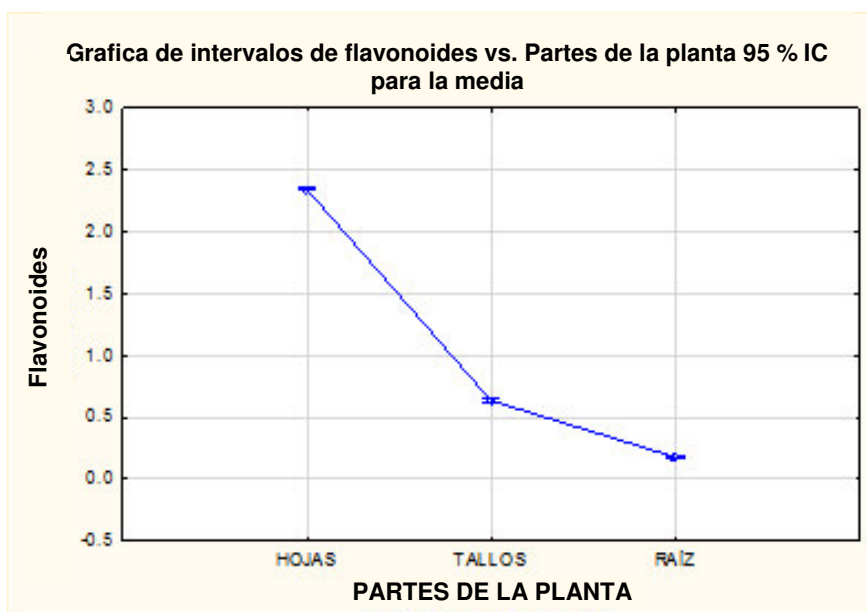
Tabla de Análisis de la prueba de Tukey				
Tukey HSD test; variable Concentración de Ac. Gálico/g de Extracto seco (μmol/g) (Spreadsheet1) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .17567, df = 6.0000				
Cell No.	PARTES DE LA PLANTA	{1}	{2}	{3}
1	TALLO	148.64	51.456	103.93
2	RAÍZ	0.000227	0.000227	0.000227
3	HOJAS	0.000227	0.000227	0.000227

La diferencia de medias es significativa al nivel de 0.05.

Anexo N°13: Análisis estadístico ANOVA y prueba de Tukey del contenido de flavonoides de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey

Tabla de Análisis de Varianza (ANOVA)					
Effect	Univariate Results for Each DV (Spreadsheet1) Over-parameterized model Type III decomposition				
	Degr. of Freedom	Concentración de Quercitina/g de Extracto seco (μmol/g) SS	Concentración de Quercitina/g de Extracto seco (μmol/g) MS	Concentración de Quercitina/g de Extracto seco (μmol/g) F	Concentración de Quercitina/g de Extracto seco (μmol/g) p
Intercept	1	9.973423	9.973423	27768.71	0.000000
PARTES DE LA PLANTA	2	7.811207	3.905604	10874.26	0.000000
Error	6	0.002155	0.000359		
Total	8	7.813362			

gl: grados de libertad, SS: Suma de cuadrados, MS: Cuadrado medio, F: estadístico de prueba, p: valor de probabilidad ($p < 0.05$ significancia estadística, $p > 0.05$ no hay significancia estadística).



La desviación estándar agrupada se utilizó para calcular los intervalos

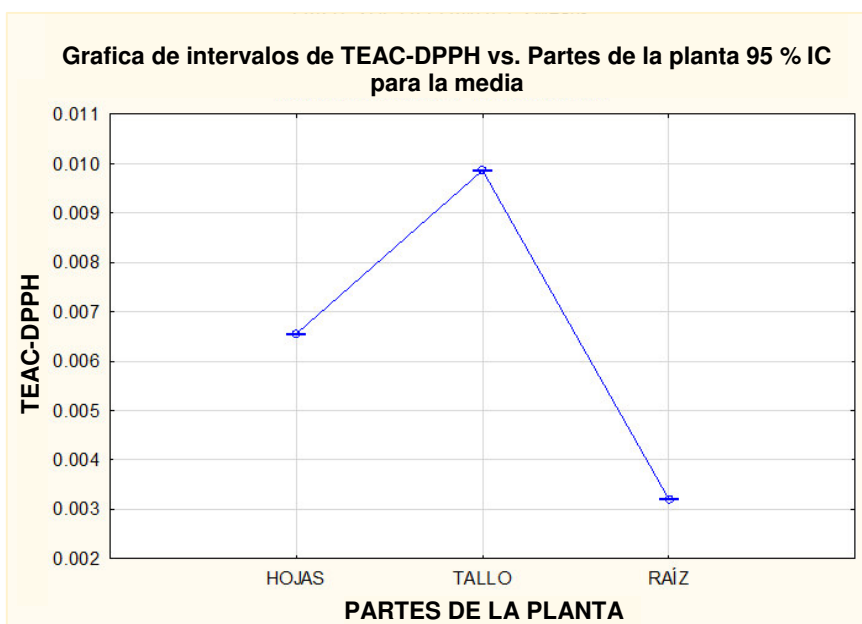
Tabla de Análisis de la prueba de Tukey				
Cell No.	Tukey HSD test; variable Concentración de Quercitina/g de Extracto seco (μmol/g) (Spreadsheet1) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .00036, df = 6.0000			
	PARTES DE LA PLANTA	{1}	{2}	{3}
1	TALLO	.63521	.17923	2.3436
2	RAÍZ	0.000227	0.000227	0.000227
3	HOJAS	0.000227	0.000227	

La diferencia de medias es significativa al nivel de 0.05.

Anexo N°14: Análisis estadístico ANOVA y prueba de Tukey de la actividad antioxidante por el método DPPH de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey

Tabla de Análisis de Varianza (ANOVA)					
Effect	Univariate Results for Each DV (Spreadsheet1) Over-parameterized model Type III decomposition				
	Degr. of Freedom	TEAC-DPPH SS	TEAC-DPPH MS	TEAC-DPPH F	TEAC-DPPH p
Intercept	1	0.000385	0.000385	817619.4	0.000000
PARTES DE LA PLANTA	2	0.000067	0.000033	70695.0	0.000000
Error	6	0.000000	0.000000		
Total	8	0.000067			

gl: grados de libertad, SS: Suma de cuadrados, MS: Cuadrado medio, F: estadístico de prueba, p: valor de probabilidad ($p < 0.05$ significancia estadística, $p > 0.05$ no hay significancia estadística).



La desviación estándar agrupada se utilizó para calcular los intervalos

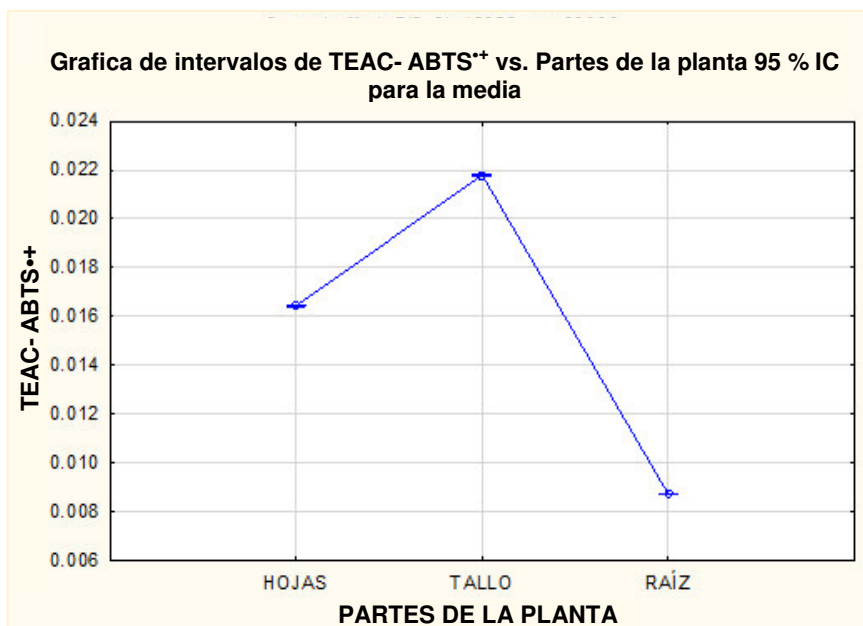
Tabla de Análisis de la prueba de Tukey					
Cell No.	Tukey HSD test; variable TEAC-DPPH (Spreadsheet1) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .00000, df = 6.0000				
	PARTES DE LA PLANTA	{1}	{2}	{3}	
1	HOJAS	.00655	.00986	.00320	
2	TALLO	0.000227		0.000227	
3	RAÍZ	0.000227	0.000227		

La diferencia de medias es significativa al nivel de 0.05.

Anexo N°15: Análisis estadístico **ANOVA** y prueba de **Tukey** de la **actividad antioxidante** por el método **ABTS⁺⁺** de los extractos hidroalcohólicos de hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey

Tabla de Análisis de Varianza (ANOVA)					
Effect	Univariate Results for Each DV (Spreadsheet1) Over-parameterized model Type III decomposition				
	Degr. of Freedom	TEAC - ABTS SS	TEAC - ABTS MS	TEAC - ABTS F	TEAC - ABTS p
Intercept	1	0.002206	0.002206	832434.5	0.000000
PARTES DE LA PLANTA	2	0.000259	0.000130	48923.1	0.000000
Error	6	0.000000	0.000000		
Total	8	0.000259			

gl: grados de libertad, **SS**: Suma de cuadrados, **MS**: Cuadrado medio, **F**: estadístico de prueba, **p**: valor de probabilidad ($p < 0.05$ significancia estadística, $p > 0.05$ no hay significancia estadística).



La desviación estándar agrupada se utilizó para calcular los intervalos

Tabla de Análisis de la prueba de Tukey					
Cell No.	Tukey HSD test; variable TEAC - ABTS (Spreadsheet1) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .00000, df = 6.0000				
	PARTES DE LA PLANTA	{1}	{2}	{3}	
1	HOJAS	.01644	.02180	.00872	
2	TALLO	0.000227		0.000227	
3	RAÍZ	0.000227	0.000227		

La diferencia de medias es significativa al nivel de 0.05.

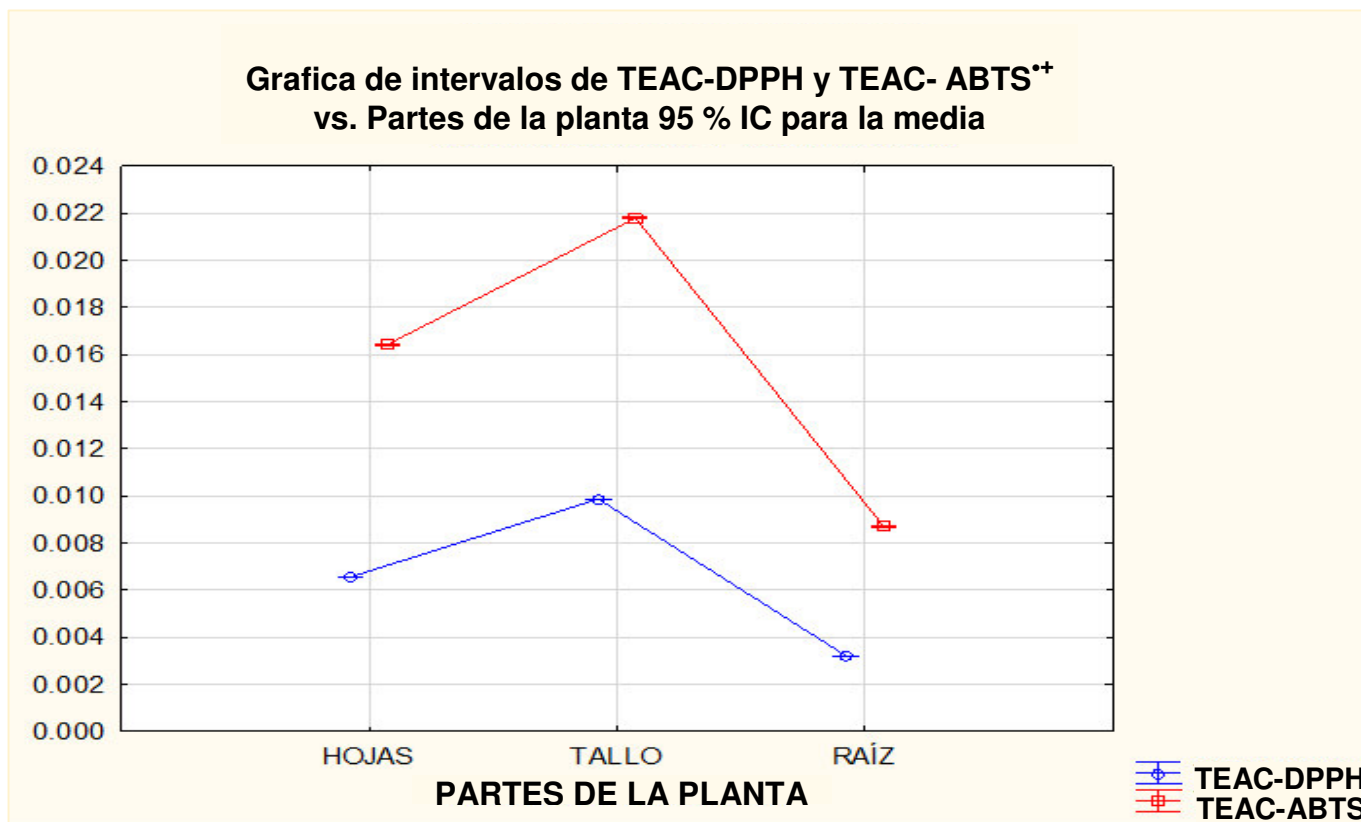


Figura 11. Comparación de las medias de la capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) por los métodos de DPPH y ABTS^{•+}.

Nota:

Para el análisis estadístico considerar:

- **H₀:** Hipótesis nula: Los promedios de **X** de los extractos hidroalcohólicos de las hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey son iguales
- **H₁:** Hipótesis alternativa: Por lo menos uno de los promedios de **X** de los extractos hidroalcohólicos de las hojas, tallo y raíz de *Argemone subfusiformis* G.B. Ownbey difiere de las demás en cuanto a su valor esperado.

X: Determinación de compuestos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS^{•+}.

